

Enzymimmunologischer Nachweis des
Mykotoxins Zearalenon in Speiseölen, Sahne
und kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen

Julia Catharina Dinkelacker



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

**Enzymimmunologischer Nachweis des Mykotoxins Zearalenon in
Speiseölen, Sahne und kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Catharina Dinkelacker

Tierärztin aus Friedrichshafen

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
Prof. Dr. habil. C. Ewers

Tag der Disputation: 13.05.2015

Meinen Eltern

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

DINKELACKER, J., Y. ACKERMANN, C. GASSEN und E. USLEBER (2011):

Determination of zearalenone in edible oils by enzyme immunoassay

Abstracts 33. Mykotoxin-Workshop, Freising, 30.05.-01.06.2011

DINKELACKER, J., Y. ACKERMANN und E. USLEBER (2011):

Bestimmung von Zearalenon in Sahne und kakaohaltigen Milcherzeugnissen mittels
Enzymimmunttest

Abstracts 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V., Garmisch-Partenkirchen

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX

1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM.....	3
2.1 Allgemeines zu Zearalenon	3
2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften von Zearalenon	3
2.3 Bildung und Vorkommen von Zearalenon	5
2.4 Toxizität und Risikobewertung von Zearalenon.....	7
2.5 Metabolismus von Zearalenon nach oraler Aufnahme.....	13
2.6 Carry over von ZEA	16
2.7 Analytik von ZEA	17
2.7.1 Extraktion und Aufreinigung	17
2.7.2 Biologische Nachweisverfahren	22
2.7.3 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren.....	22
2.7.3.1 Dünnschichtchromatographie	22
2.7.3.2 Flüssigkeitschromatographie (LC), Hochdruckflüssigkeits- chromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS). ..	24
2.7.3.3 Gaschromatographie.....	30
2.7.4 Immunologische Verfahren	31
2.8 Informationen über die untersuchten Produktgruppen	35
2.8.1 Pflanzliche Speiseöle	35
2.8.1.1 Herstellung.....	37

2.8.1.2	Vorkommen von ZEA in Speiseölen	39
2.8.2	Sahne	44
2.8.2.1	Herstellung.....	45
2.8.2.2	Vorkommen von ZEA in Sahne und Sahneerzeugnissen....	45
2.8.3	Kakaohaltige Milchmischgetränke und Schokoladendesserts.....	45
2.8.3.1	Allgemeines über Kakao	45
2.8.3.2	Herstellung und Kakaogehalte von kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen und Schokoladendesserts.....	48
2.8.3.3	Mykotoxine in Kakao	50
2.9	Gesetzliche Grundlagen für Höchstgrenzen für ZEA in Deutschland und der Europäischen Union	53
3	MATERIAL UND METHODEN	56
3.1	Materialien und Geräte	56
3.1.1	Mykotoxinstandard	56
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	56
3.1.3	Immunreagenzien.....	57
3.1.4	Chemikalien und Biochemika	58
3.1.5	Geräte und Hilfsmittel.....	59
3.1.6	Enzymimmuntests.....	60
3.1.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	60
3.1.8	Probenmaterial.....	61
3.2	Methoden	63
3.2.1	Etablierung der enzymimmunologischen Untersuchungsverfahren für den Nachweis von ZEA	64
3.2.1.1	Herstellung und Überprüfung des Toxinstandards	64
3.2.1.2	Überprüfung und Untersuchungen zur Optimierung des Testsystems für den Nachweis von Zearalenon.....	65
3.2.1.2.1	Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens	66
3.2.2	Untersuchung von Probenmaterialien.....	66
3.2.2.1	Vorbereitung und Extraktion	66

3.2.2.1.1	Aufreinigung der Proben mittels C-18-Kartuschen68
3.2.2.1.2	Aufreinigung der Proben mittels Immunaффinitäts-säulen69
3.2.2.2	Untersuchung der Probenmaterialien mittels EIA70
3.2.2.3	Untersuchung der Probenmaterialien mittels HPLC70
3.2.2.3.1	HPLC-Fraktionierung73
3.2.2.4	Vergleichsuntersuchungen von Schokoladendesserts mittels LC-MS/MS73
3.2.3	Laborvergleichsstudie74
4	ERGEBNISSE75
4.1	Etablierung des Untersuchungsverfahrens75
4.1.1	Überprüfung des Toxinstandards75
4.1.2	Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA75
4.1.2.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit75
4.1.3	Probenvorbereitungsverfahren77
4.1.3.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens77
4.1.3.2	Lagerungsfähigkeit der Extrakte80
4.1.3.3	Ergebnisse der Probenvorbereitung unter Verwendung von C-18-Kartuschen und Immunaффinitätssäulen82
4.1.4	Untersuchung mittels HPLC zum Nachweis von ZEA84
4.1.4.1	Ergebnisse der Anwendung von Methode 1 (alkalische Extraktion und IAC)84
4.1.4.2	Ergebnisse der Anwendung von Methode 2 (alkalische Extraktion und SPE und IAC)86
4.1.4.3	HPLC-Fraktionierung89
4.2	Untersuchung der Probenmaterialien auf ZEA mittels EIA und HPLC89
4.2.1	Speiseöle89
4.2.2	Sahne91
4.2.3	Kakaohaltige Milchmischgetränke93
4.2.4	Schokoladendesserts94

4.3	Weiterführende Untersuchungen mittels LC-MS/MS.....	97
4.4	Laborvergleichsstudie	98
4.4.1	Überprüfung der Testrobustheit des enzymimmunologischen Nachweises von ZEA in Speiseölen anhand der Laborvergleichsstudie der BAM.....	101
5	DISKUSSION	103
5.1	Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für ZEA	105
5.2	Anwendbarkeit der eingesetzten Aufreinigungsverfahren für ZEA	106
5.3	Methodenvergleich EIA und HPLC	107
5.4	Weiterführende Untersuchungen mittels LC/MS-MS.....	108
5.5	Aussagekraft der Laborvergleichsstudie	109
5.6	Vorkommen von ZEA in verschiedenen Lebensmittelgruppen	110
5.6.1	Speiseöle.....	110
5.6.2	Sahne.....	110
5.6.3	Kakaohaltige Milchmischgetränke	111
5.6.4	Schokoladendesserts	112
5.7	Schlussfolgerungen	112
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	SUMMARY	116
8	LITERATURVERZEICHNIS	118
9	DANKSAGUNG.....	151
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	152

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Chemisch-physikalische Charakteristika von ZEA	4
Tabelle 2:	Seitenketten von ZEA und einiger Analoga	5
Tabelle 3:	Daten verschiedener Studien zur akuten Toxizität (LD ₅₀) von ZEA (nach JECFA, 2000).....	8
Tabelle 4:	Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für ZEA aus verschiedenen Probenmaterialien	20
Tabelle 5:	Anwendung dünnschichtchromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA.....	24
Tabelle 6:	Anwendung hochdruckflüssigkeitschromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA.....	27
Tabelle 7:	Anwendung flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von ZEA	29
Tabelle 8:	Anwendung gaschromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA.....	31
Tabelle 9:	Untersuchungen verschiedener Probenmaterialien auf ZEA unter der Verwendung enzymimmunologischer Verfahren	34
Tabelle 10:	Zusammenfassung bisheriger Untersuchungen von Speiseölen auf ZEA	43
Tabelle 11:	Zusammenstellung von Daten zur Belastung von Kakao und Kakaoprodukten mit Mykotoxinen	51
Tabelle 12:	Auszug aus der Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen.....	55
Tabelle 13:	Relative Kreuzreaktionen des ZEA-Antiserums (Pool Kaninchen 14) mit strukturverwandten Analoga (nach SEIDLER, 2007)	58
Tabelle 14:	Produktgruppen und Anzahl der untersuchten Proben.....	61
Tabelle 15:	Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von ZEA.....	77

Tabelle 16:	Wiederfindungsraten für ZEA in verschiedenen Probenmatrizes mittels EIA.....	78
Tabelle 17:	Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen natürlich mit ZEA kontaminierter Ölproben	79
Tabelle 18:	Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen verschiedener natürlich mit ZEA kontaminierter kakaohaltiger Proben.....	79
Tabelle 19:	ZEA-Gehalte in Schokoladendesserts nach Lagerung der Extrakte	81
Tabelle 20:	Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Schokoladendessert-Proben nach Aufreinigung mittels C-18-Kartuschen	83
Tabelle 21:	Vergleich der im EIA ermittelten ZEA-Konzentrationen verschiedener Proben (Speiseöle und Schokoladendesserts) bei der Extraktion mit als auch ohne Anwendung von C-18-Kartuschen..	83
Tabelle 22:	Vergleich der Ergebnisse von EIA und HPLC (Methode 1)	86
Tabelle 23:	Vergleich der Ergebnisse von EIA und HPLC (Methode 2)	89
Tabelle 24:	Vorkommenshäufigkeit von ZEA und ZEA-Konzentrationen in verschiedenen Speiseölprodukten.....	90
Tabelle 25:	Vergleich der im EIA und in der HPLC gemessenen ZEA- Konzentrationen verschiedener kakaohaltiger Milchmischgetränke ...	94
Tabelle 26:	Im EIA ermittelte ZEA-Konzentrationen der verschiedenen Schokoladendesserts	95
Tabelle 27:	Vergleich der im EIA und in der HPLC gemessenen ZEA- Konzentrationen verschiedener Schokoladendessertproben	96
Tabelle 28:	Mittels EIA analysierte ZEA-Gehalte ausgewählter Erzeugnisse von Schokoladendesserts, Untersuchung von jeweils zwei unterschiedlichen Chargen jedes Erzeugnisses.....	96
Tabelle 29:	Mittels EIA und LC-MS/MS detektierte ZEA- und Zearalanon- Gehalte in verschiedenen Schokoladendessertproben.....	97
Tabelle 30:	Von allen an der Laborvergleichsstudie teilnehmenden Laboratorien ermittelten ZEA-Konzentrationen aller Proben sowie der Testlösung	99
Tabelle 31:	ZEA-Gehalte der von der BAM erhaltenen Proben, gemessen mittels EIA unter unterschiedlichen Extraktionsbedingungen.....	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Grundgerüst von ZEA (Nummerierung des Ringsystems nach IUPAC-Nomenklatur wie von METZLER, 2010 beschrieben)	4
Abbildung 2:	Chemische Strukturen von Zearalenon und seinen Derivaten.....	11
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Einteilung immunologischer Verfahren in der Mykotoxinanalytik.....	32
Abbildung 4:	Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtzahl der untersuchten Lebensmittelproben	61
Abbildung 5:	Zusammensetzung der Produktgruppe „Schokoladendesserts“.....	62
Abbildung 6:	Zusammensetzung der Produktgruppe „Sahne“	62
Abbildung 7:	Zusammensetzung der Produktgruppe „Pflanzenöle“	63
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Spaltung und Schließung des Laktonringes von ZEA bei der alkalischen Extraktion	68
Abbildung 9:	Typisches UV-Spektrum einer ZEA-Standardlösung (20 µg ZEA/ml Acetonitril).....	75
Abbildung 10:	Typische Standardkurve des kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von ZEA.....	76
Abbildung 11:	Konzentration der im EIA ermittelten ZEA-Gehalte nach Lagerung der Extrakte (letzter Untersuchungstag).....	82
Abbildung 12:	Messungen der ZEA-Konzentration einer natürlich kontaminierten Schokoladenpudding-Probe nach Anwendung unterschiedlicher Schritte der Extraktion.....	84
Abbildung 13:	HPLC-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung mit einer Konzentration von ZEA von 200 ng/ml (Methode 1).....	85
Abbildung 14:	Chromatogramm eines natürlich mit ZEA kontaminierten kakaohaltigen Milchmischgetränks (Probe Nr. 2987; Methode 1)	85
Abbildung 15:	HPLC-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung mit einer Konzentration von ZEA von 10 µg/ml (Methode 2).....	87
Abbildung 16:	Chromatogramm eines natürlich mit ZEA kontaminierten kakaohaltigen Milchmischgetränks (Probe Nr. 2987; Methode 2)	88
Abbildung 17:	Saat-abhängige ZEA-Konzentration in Speiseölen (ZEA-Gehalt aufsteigend sortiert)	91

Abbildung 18: Mittels EIA detektierte ZEA-Konzentrationen in Schokoladensahne- Probe Nr. 2960 (sechs verschiedene Extraktionen)	92
Abbildung 19: Mittels EIA ermittelte ZEA-Konzentrationen von kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen	93
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen ZEA-Konzentrationen aller von der BAM erhaltenen Proben inklusive Standardabweichungen.....	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ADV	Automatisierte Datenverarbeitung
AE	Aktivester
AF	Aflatoxine
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
API	Atmospheric Pressure Ionisation
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Bis(trimethylsilyl)-Acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(Trimethylsilyl)-Triflouracetamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyl Transferase
DASP	Doppelantikörpertechnik
DC	Dünnschichtchromatographie
DCHC	Dynamic Covalent Hydrazine Chemistry
d. h.	das heißt
DON	Deoxynivalenol
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EEC	Estradiol Equivalent Concentration
EFSA	European Food Safety Authority; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
EIA	Enzyme Immunoassay, Enzymimmuntest
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	Electrospray Ionisation, Elektronenstoßionisation
et al.	et alii, und andere
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektion

g	Schwerebeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GLC	Gas-Flüssig-Chromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IAC	Immunoaffinity Column; Immunaффinitätssäule
IgG	Immunglobulin G
ITD	Ion Trap Detector
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
JLU	Justus-Liebig-Universität
KG	Körpergewicht
KmV	Kontaminanten-Verordnung
LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LOEL	Low Observed Effect Level
Max	Maximalwert
mg	Milligramm
Min	Minimalwert
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
mmol	Millimol
MRM	Multi-Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Trimethylsilyltrifluor-Acetamid
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Anzahl
n. n.	nicht nachweisbar
NHEL	No Hormonal Effect Level

nm	Nanometer
NOEL	No Observed Effect Level
NPD	Stickstoff/Phosphor-Detektor
NTP	National Toxicology Program
NWG	Nachweisgrenze
OTA	Ochratoxin A
p. a.	pro analysi, Reinheitsgrad für Chemikalien
PBS	Phosphate Buffered Saline, Natriumphosphat-Puffer
pH	pondus/potentia Hydrogenii (Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung)
PID	Photoionisationsdetektor
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
RIA	Radio Immunoassay
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reverse Phase
SCE	Sister Chromatid Exchange, Schwesterchromatidaustausch
SCF	Scientific Committee on Food
SCOOP	Scientific Cooperation
SEC	Size Exclusion Chromatography
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
SRM	Selected Reaction Monitoring
SULT	Sulfotransferase
TDI	Tolerable Daily Intake, tolerierbare tägliche Aufnahme
TLC	Thin Layer Chromatography
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMSDA	<i>N,N</i> -Diethyltrimethyl-Silylamin
TMS	Trimethylsilylimidazol
t _R	Retentionszeit
t _{1/2el}	Plasmaeliminations-Halbwertszeit
u. a.	unter anderem
UDPGT	Uridin-diphosphat-glucuronyl-Transferase
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
upm	Umdrehungen pro Minute

usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
Vgl.	Vergleiche
VK	Variationskoeffizient
VO	Verordnung
VSD	virtual safe dose
v/v	Volumen per Volumen
WF	Wiederfindung
WFR	Wiederfindungsrate
z. B.	zum Beispiel
ZEA	Zearalenon
ZEBS	Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Umweltchemikalien

1 EINLEITUNG

Mykotoxine sind giftige Stoffwechselprodukte bestimmter Schimmelpilze mit der Fähigkeit, Gesundheitsschäden bei Mensch und Tier hervorzurufen. Das Mykotoxin Zearalenon (ZEA; 6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -Resorcylsäurelaktone) gehört zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide. Es wird als sekundäres Stoffwechselprodukt von verschiedenen *Fusarium* Pilzen gebildet (DE NIJS et al., 1996; KUIPER-GOODMAN et al., 1987). ZEA ist durch seine östrogenartige Wirkung gekennzeichnet. Es führt nach Aufnahme, insbesondere beim Schwein, zu pathologischen Veränderungen am äußeren und inneren Genitaltrakt und zu Fertilitätsstörungen (ETIENNE und DOURMAD, 1994; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MALEKINEJAD et al., 2007; MÖLLER, 1973).

Hauptsächlich von *Fusarium* befallen und mit ZEA kontaminiert sind Mais und daraus hergestellte Produkte. Aber auch andere Getreidesorten können oft erhebliche Mengen an ZEA aufweisen (BASSEN und THIELERT, 2000; BENNETT und SHOTWELL, 1979; DE NIJS et al., 1996; D'MELLO et al., 1999; MARAGOS, 2010; SEGVIC KLARIC et al., 2009; USLEBER und MÄRTLBAUER, 1998). ZEA kommt zwar hauptsächlich in den gemäßigten Klimazonen vor, wurde aber auch schon auf tropischen Früchten, beispielsweise Bananen, gefunden (CHAKRABARTI und GHOSAL, 1986; JIMÉNEZ et al., 1997).

Da in der Europäischen Union (EU) und in anderen Ländern seit längerem Höchstmengen für ZEA in Lebens- und Futtermitteln existieren, ist dieses Toxin wahrscheinlich eines der am häufigsten in Routinekontrollen untersuchten Mykotoxine. Allerdings konzentrieren sich die meisten Untersuchungen auf das Vorkommen von ZEA in Getreide und daraus hergestellten Erzeugnissen. Aufgrund seiner starken Lipophilie reichert sich ZEA jedoch fast ausschließlich in fetthaltigen Fraktionen an, sodass beispielsweise in Getreide eine Abreicherung erfolgt, während bei der Speiseölgewinnung aus Getreide (z. B. Maiskeimöl) eine starke Anreicherung im Öl stattfindet. Daher sind vor einiger Zeit Höchstmengenregelungen für ZEA in Speiseölen aus Mais erlassen worden.

Die bisher verfügbaren Methoden zum Nachweis von ZEA in Ölen sind relativ aufwendig und zudem teuer. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es daher, einen schnellen und kosteneffizienten immunochemischen Nachweis für ZEA in Speiseölen zu etablieren und zu validieren.

Andere Lebensmittel mit hohen Fettanteilen wurden dagegen bisher praktisch nicht auf ZEA untersucht, was auch an methodischen Schwierigkeiten liegen könnte. Da für ZEA ein geringfügiger Übergang in die Milch beobachtet wurde (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992), stellte sich folglich die Frage, inwieweit eine Anreicherung von ZEA in Erzeugnissen wie beispielsweise Schlagsahne stattfinden könnte. Dies auch deshalb, da in bisherigen Untersuchungen von Milch stets nur die Magermilchfraktion geprüft worden war (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992).

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war es daher, den immunchemischen Nachweis auf die Untersuchung von ZEA in Sahne und Sahneerzeugnissen zu erweitern.

Für Kakao oder Kakaoprodukte wurden in der Literatur bisher, bis auf eine einzige Ausnahme (SCHOLTEN et al., 2010), noch keine Hinweise auf eine mögliche ZEA-Kontamination publiziert. Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich bei der Untersuchung von kakaohaltigen Milcherzeugnissen, dass hier eine mögliche Kontaminationsquelle existieren könnte. Daher sollten als weiteres Ziel Daten zum Vorkommen von ZEA in eben solchen Erzeugnissen gewonnen werden, wofür das analytische Instrumentarium erarbeitet werden musste.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines zu Zearalenon

Zearalenon (ZEA) ist innerhalb der Gruppe der Mykotoxine, der sekundären Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, einer der wichtigsten Vertreter. ZEA ist hauptsächlich ein Problem in Getreide, jedoch ist es, aufgrund eines carry-overs, auch in tierischen Produkten wie z. B. Milch zu finden (wenn auch nur nach hoher Exposition und selbst dann nur in geringer Konzentration).

In den 20er Jahren wurde erstmals über das Auftreten von Vulvovaginitiden beim Schwein in Verbindung mit Futtermitteln berichtet (McNUTT et al., 1928). Als Symptome zeigten diese Schweine neben Vulvovaginitiden auch geschwollene Gesäuge und Aborte. 1962 isolierten STOB et al. (1962) eine anabolische Substanz von mit *Gibberella zeae* infiziertem Mais. MIROCHA et al. (1967) isolierten dieselbe Substanz, Zearalenon, von gelagertem Mais, welcher mit *Fusarium graminearum* infiziert war. Die Struktur von ZEA wurde 1966 von URRY et al. (1966) ermittelt. Kurz darauf gelang VLATTAS et al. (1968) die Totalsynthese von ZEA.

2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften von Zearalenon

ZEA (6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl- β -Resorcyssäurelaktone) (SCHWADORF, 1995) gehört zu den nichtsteroidalen Mykotoxinen der Stoffgruppe der phenolischen Makrolide (Abbildung 1, Tabelle 1).

ZEA, eine weiße, kristalline, hitzestabile Substanz, weist eine geringe Löslichkeit in Wasser auf, ist jedoch in unpolarem Acetonitril, Methanol, Aceton, Chloroform und in wässrigen Alkalien und Alkoholen gut löslich (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; RYU et al., 2003).

In Tabelle 1 sind einige wichtige physikalisch-chemische Eigenschaften von ZEA aufgeführt (Angaben nach URRY et al., 1966; SYDENHAM et al., 1996):

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 1: Chemisch-physikalische Charakteristika von ZEA

Summenformel:	$C_{18}H_{22}O_5$
Chemische Bezeichnung:	6-(10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -Resorcylsäurelaktone
Synonym:	F-2-Toxin
Molekulargewicht:	318,37
Absorptionsmaxima in Methanol:	236 nm, 274 nm, 316 nm
Schmelzpunkt:	164 °C - 165 °C

Abbildung 1 zeigt das Grundgerüst von ZEA (Seitenketten von ZEA und einigen Analoga in Tabelle 2).

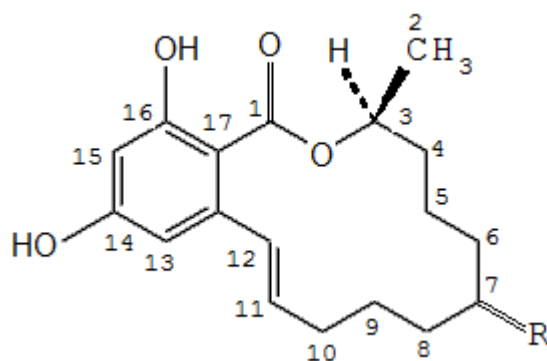


Abbildung 1: Strukturformel des Grundgerüsts von ZEA und Analoga (Nummerierung des Ringsystems entsprechend der IUPAC-Nomenklatur wie von METZLER (2010) beschrieben)

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 2: Seitenketten von ZEA und einiger Analoga (vergleiche Abbildung 1)

Toxin	C ₁₁ -C ₁₂ -Bindung	Seitenkette R
Zearalenon	CH=CH	=O
α -Zearalenol	CH=CH	OH H
β -Zearalenol	CH=CH	H OH
Zearalanon	CH ₂ -CH ₂	=O
α -Zearalanol	CH ₂ -CH ₂	OH H
β -Zearalanol	CH ₂ -CH ₂	H OH

2.3 Bildung und Vorkommen von Zearalenon

ZEA ist wie alle Mykotoxine eine niedermolekulare Substanz (<1000 Molekulargewicht) und ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt von *Fusarium graminearum*. Fusarien gehören systematisch zur Familie der *Nectriaceae*, in die Klasse der echten Schlauchpilze (*Ascomycetes*) sowie zu den *Fungi imperfecti* und sind Teil der natürlich vorkommenden Feldschimmelpilze. Sie wachsen meist in pflanzlichem Gewebe, kommen also in Getreide und anderen Lebensmitteln vor. Mittlerweile sind über 60 verschiedene *Fusarium* Spezies beschrieben, wovon viele, von den am häufigsten vorkommenden, ZEA bilden (DE NIJS et al., 1996). Hauptsächlich wird ZEA von *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* gebildet. *Fusarium* spp. sind weltweit zu finden (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Eine Vielzahl weiterer Spezies dieser Gattung ist ebenso fähig ZEA zu bilden. So zum Beispiel *F. moniliforme*, *F. sporotrichoides*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani* (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). CALDWELL et al. (1970) untersuchten sieben *Fusarium* Spezies und kamen zu dem Ergebnis, dass *F. roseum* (davon die Kultivare „Culmorum“, „Equiseti“, „Gibbosum“ und „Graminearum“) und *F. tricinctum* ZEA bilden. ZEA tritt oft gleichzeitig mit anderen Fusarientoxinen, wie beispielsweise Deoxynivalenol (DON), auf (EFSA, 2004).

2. SCHRIFTTUM

Viele Faktoren wie Temperatur, Vegetationsperiode oder die Pilz-Spezies beeinflussen die Menge an gebildetem Zearalenon. Die größten Mengen an ZEA, welche von *Fusarium* gebildet wurden, wurden bei einer Temperatur unterhalb von 25 °C und bei 16 % Luftfeuchtigkeit gefunden (GAJECKA et al., 2004; PARK et al., 1996; ZWIERZCHOWSKI et al., 2005). ZEA wird also hauptsächlich bei feuchter Witterung gebildet (vor allem während der Blütezeit der Pflanzen). Als weitere Faktoren für *Fusarium* Befall gelten übermäßige Stickstoffversorgung, pfluglose Bodenbearbeitung und enge Getreidefruchtfolgen. Auch die Kohlenstoffversorgung beeinflusst die Toxinproduktion. Bei sachgemäßer, trockener Lagerung erfolgt nach der Ernte keine weitere ZEA Bildung (DÄNICKE und VALENTA, 1999; DE NIJS et al., 1996).

Häufig von *Fusarium* spp. befallen und mit ZEA kontaminiert sind Mais und daraus hergestellte Produkte wie Polenta oder Maismehl (BASSEN und THIELERT, 2000; USLEBER und MÄRTLBAUER, 1998). Aber auch in Weizen, Hafer, Gerste, Hirse sowie weiteren Getreidearten können oft erhebliche Mengen an ZEA nachgewiesen werden (BENNETT und SHOTWELL, 1979; DE NIJS et al., 1996; D'MELLO et al., 1999; MARAGOS, 2010; SEGVIC KLARIC et al., 2009). Verschiedene Studien belegen darüber hinaus das Vorkommen von ZEA in Reis (DORS et al., 2011; MAKUN et al., 2011; THIEU et al., 2008). Durch die Weiterverarbeitung dieser Getreide kann ZEA auch in den verschiedensten Erzeugnissen hiervon auftreten und somit in die menschliche Nahrungsmittelkette gelangen oder in Tierfutter zu finden sein (GROMADZKA et al., 2008; KAPPENSTEIN et al., 2005a; ZINEDINE et al., 2007). Die hohe Fettlöslichkeit von ZEA lässt eine Akkumulation des Toxins in Fettfraktionen vermuten. So wurde die Anwesenheit von ZEA in verschiedenen Speiseölen bereits bestätigt (KAPPENSTEIN et al., 2005a; KAPPENSTEIN et al., 2005b; MAJERUS et al., 2009; SIEGEL et al., 2010) (siehe Kapitel 2.8.1.2).

Aber auch in Gemüse (Bohnen, Kartoffelprodukten) sowie in Sonnenblumen- und Kürbiskernen und Haselnüssen konnte bereits ZEA nachgewiesen werden (SCHOLLENBERGER et al., 2005). Außerdem wurden schon viele weitere Produkte wie Feigen, Paprika, Chili, Bier oder Gewürze positiv auf ZEA getestet (MARAGOS, 2010; ZINEDINE et al., 2007).

Entsprechend des Vorkommens toxinbildender Fusarienarten wird ZEA zwar hauptsächlich in den gemäßigten Klimazonen gefunden, aber auch in tropischen

Klimazonen ist mit dem Vorkommen von ZEA zu rechnen. So wurde ZEA beispielsweise schon auf Bananen detektiert (CHAKRABARTI und GHOSAL, 1986; JIMÉNEZ et al., 1997). Anhand der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur ist ZEA ein weltweites Problem. Berichte über ZEA-kontaminiertes Getreide liegen aus Asien, zum Beispiel aus Japan, Malaysia oder Vietnam (AOYAMA et al., 2008; SOLEIMANY et al., 2012; THIEU et al., 2008), aus Südamerika und aus Afrika (GONZALEZ PEREYRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011) vor. Für europäische Länder wurde eine sehr umfangreiche Literaturzusammenstellung zur Belastung von Lebensmitteln mit Fusarientoxinen in 2003 im Bericht der Scientific Cooperation SCOOP Nr. 3.2.10 (EUROPEAN COMMISSION, SCOOP, 2003) veröffentlicht.

2.4 Toxizität und Risikobewertung von Zearalenon

ZEA wies bei oraler Verabreichung an Mäuse, Ratten und Meerschweinchen eine sehr geringe akute Toxizität (orale LD₅₀-Werte von > 2000-20.000 mg/kg Körpergewicht) auf (FLANNIGAN, 1991). Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse einiger Studien zur akuten Toxizität (LD₅₀) von ZEA bei Tieren (JECFA, 2000).

ZEA und seine Metaboliten sind nichtsteroidale, östrogenähnliche Verbindungen, die im Organismus ähnlich den körpereigenen Östrogenen wirken. Sie sind Östrogenagonisten und binden an Östrogenrezeptoren, wobei die Bindungsaffinität abhängig von der Tierspezies ist. Durch den ZEA-Östrogen-Rezeptor-Komplex wird die DNA zur Bildung von rRNA und mRNA angeregt, wodurch es zur Proteinbiosynthese durch die Ribosomen kommt. ZEA besitzt somit anabole Wirkungen. Eine Zusammenstellung der toxischen Wirkungen findet sich beispielsweise bei KUIPER-GOODMAN et al. (1987) aber auch in den Risikobewertungen der JECFA (2000) bzw. des wissenschaftlichen Ausschusses der Europäischen Kommission SCF (EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2000). Auch die ZEA-Analoga (siehe Abbildung 2) besitzen östrogenartige Wirkungen in unterschiedlichen Stärken. α -Zearalanol (Synonyme: Zearanol, Ralgro[®]) beispielsweise besitzt eine deutlich höhere Wirksamkeit als ZEA und wird deshalb auch in einigen Ländern gezielt als Leistungsförderer bei Masttrindern eingesetzt (LANGE et al., 2001). Die meisten klinischen Symptome, die durch ZEA hervorgerufen werden, treten demzufolge durch die Hyperstimulation der östrogenabhängigen Gewebe auf.

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 3: Daten verschiedener Studien zur akuten Toxizität (LD₅₀) von ZEA (nach JECFA, 2000)

Spezies	Geschlecht	Art der Verabreichung	LD ₅₀ (mg/kg KGW)	Quellen
Maus	m/w	oral	>2000	NTP, 1982
Maus	w	oral	>20.000	Hidy et al., 1977
Maus	w	intraperitoneal	>500	Hidy et al., 1977
Ratte	m/w	oral	>4000	NTP, 1982
Ratte	m/w	oral	>10.000	Hidy et al., 1977
Ratte	m	intraperitoneal	5500	Hidy et al., 1977
Meerschweinchen	w	oral	>5000	Hidy et al., 1977
Meerschweinchen	w	intraperitoneal	2500	Hidy et al., 1977

Wesentlich für die Relevanz von ZEA bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind die chronischen Auswirkungen durch die hormonelle Aktivität. Am häufigsten betroffen von den Auswirkungen von ZEA ist das Schwein (Sauen und Ferkel), da es relativ sensibel auf die östrogenen Wirkungen reagiert. Zeichen eines Hyperöstrogenismus sind Vulvovaginitiden, Anöstrus, Brunstverzögerungen, verlängerter Östrus, Veränderungen der Libido, Unfruchtbarkeit, vermehrtes Auftreten von Scheinträchtigkeiten, Schwellungen des Gesäuges und des Uterus, Störungen der Laktation (ETIENNE und DOURMAD, 1994; KUIPER-GOODMAN et al., 1987; MÖLLER, 1973) sowie Störungen der Oozytenreifung (MALEKINEJAD et al., 2007). Einige Studien (DÄNICKE et al., 2007a; TIEMANN et al., 2008a; TIEMANN et al., 2008b) ergaben als auffälligsten Befund Leber- bzw. Milzveränderungen; ZEA war in der Gallenflüssigkeit bei Sauen, die während der Trächtigkeit mit ZEA-kontaminiertem Futter gefüttert wurden, nachweisbar. Auch bei den von diesen Sauen geborenen Ferkeln war ZEA in der Gallenflüssigkeit nachweisbar; Organveränderungen wurden jedoch hier nicht festgestellt (DÄNICKE et al., 2007a; TIEMANN et al., 2008b).

Männliche Schweine reagieren mit Zitzen- und Präputialschwellungen, die den Harnabsatz erschweren können (CHANG et al., 1979) sowie mit einer Abnahme des Gewichts der Hoden und veränderter Libido (ETIENNE und DOURMAD, 1994; MÖLLER, 1973). Eine Beeinflussung der Spermaqualität von Ebern, d. h. der Motilitätsparameter, konnte jedoch nicht gezeigt werden (TSAKMAKIDIS et al., 2007).

2. SCHRIFTTUM

Wiederkäuer reagieren deutlich weniger sensibel auf ZEA als Schweine. Bei höheren Dosen werden jedoch auch verschiedene Symptome wie Frühaborte, Frühgeburten, vermehrte Fruchtresorptionen, Festliegen nach der Geburt, verlängerte Zwischenkalbezeit, vermehrt Nachgeburtsverhaltungen, Erhöhung der Mastitishäufigkeit, Reduzierung der Milchleistung sowie fehlende Vitalität und ansteigende Kälberverluste beobachtet. (D'MELLO et al., 1999; HÖRÜGEL et al., 2003). Bei Ziegen wurden nach einer einmaligen intravenösen ZEA-Dosis Schwellungen der Leber und Lymphozyteninfiltration in diese festgestellt (DONG et al., 2010).

Geflügel scheint relativ resistent gegenüber den östrogenen Effekten von ZEA zu sein. Selbst bei hohen oralen Dosen bis zu 59 mg/kg wurden bei Hühnern keine Veränderungen der Eierproduktion bzw. der Eiergröße beobachtet (ALLEN et al., 1980; KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Klinische Erscheinungen durch ZEA-kontaminiertes Futter sind auch schon bei Hunden beschrieben worden. So wurde zum einen eine geringere Anzahl an Corpora lutea beobachtet, zum anderen eine gestörte Spermatogenese bei männlichen Hunden festgestellt. Auch Ödeme sowie Hyperplasien der Eileiter und des Uterus wurden beschrieben (BOERMANS und LEUNG, 2007).

Die Wirkung einer oralen Aufnahme des östrogenartig wirkenden ZEA auf den Menschen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Beeinflussung der Brustkrebshäufigkeit wird diskutiert (AHAMAD et al., 2001; YU et al., 2005). Möglich scheint auch zu sein, dass ZEA eine frühzeitige Pubertät in Gang setzt. So wurde in Italien das Blut von frühpubertierenden Mädchen auf ZEA getestet. Diejenigen Patienten, bei denen ein erhöhter ZEA-Spiegel nachgewiesen werden konnte, waren größer und schwerer als die ZEA-negativen Patienten (MASSART et al., 2008; MASSART und SAGGESE, 2010). BANDERA et al. (2011) fanden im Gegensatz dazu allerdings heraus, dass Mädchen, bei denen ZEA im Urin nachgewiesen werden konnte, kleiner sind und weniger Brustentwicklung zeigen als ihre Altersgenossinnen. Sie mutmaßen also einen antiöstrogenen Effekt von ZEA bei Menschen.

Zusätzlich zu seinen östrogenen Eigenschaften weist ZEA noch hämatotoxische Merkmale auf. MAAROUFI et al. (1996) beobachteten Störungen der Blutgerinnung sowie Veränderungen einiger Blutparameter und ausgewählter biochemischer Bestandteile des Blutes bei Ratten.

LIOI et al. (2004) zeigten die Genotoxizität von ZEA auf. In *in vitro* Kulturen von bovinen Lymphozyten wurden Chromosomenanomalien sowie ein vermehrter Schwesterchromatidaustausch (SCE, sister chromatid exchange) beobachtet. Die Genotoxizität von ZEA *in vivo* und *in vitro* wurde auch von AYED et al. (2011) gezeigt. ABID-ESSEFI et al. (2009) beschrieben bei steigenden ZEA-Dosen eine Zunahme des Zelltods bei Zellkulturen. Dies geschah auch bei Zugabe der ZEA-Analoga α -Zearalenol und β -Zearalenol. Dennoch kam die Mehrzahl der einschlägigen wissenschaftlichen früheren Untersuchungen zu dem Schluss, dass ZEA nicht genotoxisch sei (JECFA, 2000). Allerdings scheint nach neueren Untersuchungen ZEA clastogene Eigenschaften zu haben (EFSA, 2011). Da allerdings beispielsweise ein erhöhtes Risiko für Hypophysenadenome bei Mäusen erst bei einer Aufnahme weit oberhalb (etwa 25000-fach) des TDIs für ZEA (0,25 $\mu\text{g/kg KGW}$) (EFSA, 2011) beobachtet wurde, kam der Ausschuss für Schadstoffe in der Nahrungsmittelkette (Panel on Contaminants in the Food Chain) der EFSA zu dem Schluss, dass die kritischen Effekte von ZEA in seinen östrogenen und nicht in den genotoxischen Eigenschaften begründet sind.

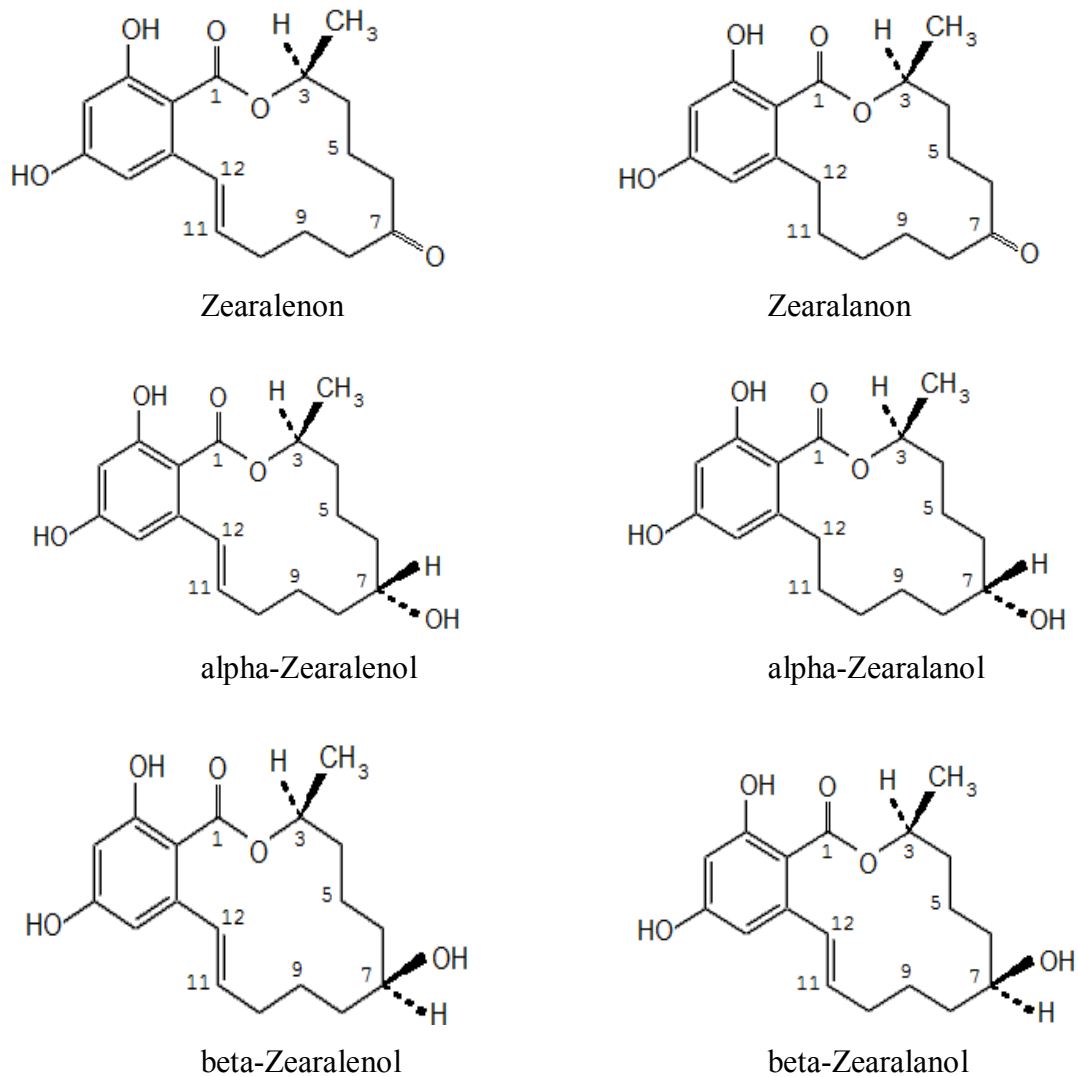


Abbildung 2: Chemische Strukturen von Zearalenon und seinen Derivaten

Um abzuschätzen, wie relevant ZEA für Verbraucher sowie für Tiere ist, ist es notwendig, die geschätzte Zufuhr von ZEA mit jener Aufnahme zu vergleichen, bei der toxische Effekte vermutet bzw. festgestellt werden. Üblicher ist es, diese mit tolerierbaren Dosen zu vergleichen. Diese tolerierbaren Dosen werden in Toxizitätsversuchen ermittelt und mit Sicherheitsfaktoren abgestimmt.

Eine frühe Schätzung einer tolerierbaren Tagesaufnahme wurde von KUIPER-GOODMAN et al. (1987) durchgeführt. Sie legten den NHEL (No Hormonal Effect Level) auf 0,1 µg/kg Körpergewicht/Tag fest, während die sichere Dosis (VSD, virtual safe dose) anhand von Tumorigenitätsdaten auf 0,05 µg/kg Körpergewicht/Tag errechnet wurde.

2. SCHRIFTTUM

Einige Jahre später haben mehrere internationale Gremien eine Risikobewertung von ZEA durchgeführt. Eines davon ist der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). ERIKSEN et al. (2000) ermittelten bei diesem Gremium anhand der Daten aus der NTP Studie (1982) eine sichere Aufnahmemenge von 0,05 µg ZEA/kg KG/Tag. Grundlegend war die Dosis, die keine hormonellen Effekte bei Schweinen, der sensibelsten Spezies, hervorrief. Es wurde ein NOEL (No Observed Effect Level) von 40 µg/kg KG/Tag in einer 15-tägigen Studie an weiblichen Schweinen ermittelt. Verrechnet mit einem Sicherheitsfaktor von 100 ergab sich daraus eine vorläufige maximal tolerierbare Tagesaufnahme (PMTDI) von 0,5 µg/kg Körpergewicht. Mithilfe dieser Studie rechnete die Kommission auch den LOEL (Low Observed Effect Level) aus. Dieser beträgt 200 µg/kg Körpergewicht/Tag.

ZEA wurde ebenso durch den SCF (Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins Part 2: Zearalenone (ZEA) 22. Juni 2000, SCF/CF/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final) bewertet. Trotz identischer Datenlage wurde hier eine vorläufige tolerierbare Tagesaufnahme (tTDI) von 0,2 µg/kg Körpergewicht ermittelt. Dies erklärt sich anhand eines Sicherheitsfaktors von 200, welcher durch unzureichende Datenlage begründet wurde. Weiterhin wurde durch das Gremium die durchschnittliche Tagesaufnahme für verschiedene Länder geschätzt. Diese liegt zwischen 0,02 µg/kg Körpergewicht und 0,06 mg/kg Körpergewicht.

Auch aus dem SCOOP Task 3.2.10 geht hervor, dass die durchschnittliche ZEA-Aufnahme der erwachsenen europäischen Bevölkerung unter dem tTDI liegt. Laut dem Bericht der EFSA (2004) lässt sich eine durchschnittliche ZEA-Aufnahme für landwirtschaftliche Nutztiere nicht errechnen, da es eine große Variabilität an Futterzusammensetzungen gibt und die einzelnen Futterkomponenten auch unterschiedlich stark mit ZEA kontaminiert sein können.

Im Jahr 2011 wurde von dem Ausschuss für Schadstoffe in der Nahrungsmittelkette (Panel on Contaminants in the Food Chain) der EFSA ein TDI von ZEA von 0,25 µg/kg Körpergewicht ermittelt (EFSA, 2011). Grundlage dafür waren Studien über die sensible Spezies Schwein (östrogene Effekte von ZEA) und Vergleiche zwischen ihnen und der menschlichen Spezies. Bezugnehmend auf vorhandene Daten über das Vorkommen von ZEA in verschiedenen Produktgruppen kam der Ausschuss zu der Erkenntnis, dass die

ZEA-Aufnahme des durchschnittlichen Verbrauchers unterhalb des TDI, bzw. in der Nähe dessen liegt.

2.5 Metabolismus von Zearalenon nach oraler Aufnahme

ZEA wird nach oraler Verabreichung sehr schnell resorbiert; vor allem von Ratten, Kaninchen und Menschen (KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Die absolute Resorption von ZEA bei Schweinen nach einer einmaligen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht wird zwischen 80-85 % vermutet (BIEHL et al., 1993). Die bevorzugte Ausscheidung über die Galle erschwert allerdings die präzise Bestimmung der Bioverfügbarkeit.

Es werden drei Hauptmetabolisierungswege für ZEA in Tieren vermutet: Erstens die Hydroxylierung zu α -Zearalenol und β -Zearalenol als auch in kleineren Mengen zu den korrespondierenden Zearalanolen (siehe Abbildung 2) durch die 3 α - bzw. 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD); zweitens eine Glucuronidierung von ZEA und seinen Metaboliten durch die Uridin-diphosphat-glucuronyl-Transferase (UDPGT). Weiterhin finden auch Sulfatierungsreaktionen durch Sulfotransferasen (SULTs) statt (EFSA, 2011; ZINEDINE et al., 2007). Neuerdings wurde als dritter Metabolisierungsweg eine Monohydroxylierung von ZEA durch Mikrosomen der humanen Leber beobachtet (PFEIFFER et al., 2009). Dies geschieht durch das humane Cytochrom P450 (hCYP). Zwei der Hauptmetaboliten wurden durch mit Deuterium-markiertem ZEA als Katechole identifiziert. Diese beiden Metaboliten sind Substrate für die Catechol-O-methyl Transferase (COMT). Die östrogenen Eigenschaften dieser Katechole sind allerdings noch nicht erforscht.

Obwohl ZEA vor allem in der Leber metabolisiert wird, haben dennoch viele weitere Gewebe, wie beispielweise die Gonaden, der Darm, die Lunge, die Milz und das Fettgewebe auch HSD-Aktivität. ZEA unterliegt einem tierartspezifischen enterohepatischem Kreislauf und wird über die Galle ausgeschieden (D'MELLO et al., 1999).

Hinsichtlich der bevorzugt gebildeten Metaboliten existieren tierartspezifische Unterschiede. BIEHL et al. (1993) berichten über eine extensive biliäre Exkretion und einer Rückresorption des Toxins aus dem Darm beim Schwein nach einer raschen Absorption von ZEA und dessen Metabolisierung in der Leber. Somit zirkuliert ZEA lange

im Organismus, wodurch eine lange Plasmaeliminations-Halbwertszeit ($t_{1/2el}$) von 86,6 Stunden resultiert (BIEHL et al., 1993). Hauptmetaboliten beim Schwein sind α -Zearalenol und glucuronidiertes ZEA. Aber auch freies ZEA und zu einem geringen Prozentsatz β -Zearalenol konnten nachgewiesen werden (BIEHL et al., 1993; MIROCHA et al., 1981). ZEA und α -Zearalenol wurden im Urin, in der Galle und in der Leber gefunden; β -Zearalenol hingegen nur in der Galle (DÖLL et al., 2003). α -Zearalanol (Zeranol) und β -Zearalanol (Taleranol) konnten indessen noch nicht einmal in Spuren nachgewiesen werden (ZÖLLNER et al., 2002). In anderen Studien wurde im Gegensatz dazu β -Zearalenol als wichtiger Metabolit neben ZEA und α -Zearalenol in den Gallen von Zuchtsauen gefunden (MEYER et al., 2000; GOYARTS et al., 2007). Auch MALEKINEJAD et al. (2006) zeigten, dass α -Zearalenol der hepatische und der extrahepatische (Granulosa-Zellen) Hauptmetabolit beim Schwein ist.

Auch bei Rindern findet ein enterohepatischer Kreislauf von ZEA statt. Im Gegensatz zum Schwein ist allerdings β -Zearalenol der am häufigsten vorkommende Metabolit (MIROCHA et al., 1981). Nach oraler Gabe von ZEA wurde im Duodenum ZEA, α - und β -Zearalenol gefunden (DÄNICKE et al., 2005; SEELING et al., 2005). KLEINOVA et al. (2002) untersuchten die Leber und den Urin von Färsen, welche eine ZEA-reiche Diät bekamen, auf ZEA und seine Metaboliten und fanden ZEA (9 % bzw. 84 %), α -Zearalenol (9 % bzw. 10 %) und β -Zearalenol (82 % bzw. 6 %). Zearalanon, α -Zearalanol und β -Zearalanol wurden nur im Urin detektiert. Ähnliche Erkenntnisse gibt es von MIROCHA (1981). Er detektierte freie und konjugierte Formen von ZEA, α - und β -Zearalenol in Urin und Fäzes. Beim Wiederkäuer (Schaf, Rind) wird ZEA bereits im Pansen zu α -Zearalenol und zu einem kleineren Teil auch zu β -Zearalenol gespalten (KIESSLING et al., 1984). ERASMUSON et al. (1994) fanden α - und β -Zearalanol im Urin von Rindern, Schafen, Ziegen, Rehen und Pferden. Den Autoren zufolge entstehen diese Metaboliten im Organismus aus der Muttersubstanz oder werden von Fusarium Pilzen gebildet. Auch MILES et al. (1996) fanden α - und β -Zearalenol und glucuronidierte Formen von α - und β -Zearalanol im Urin von Schafen, welche ZEA-haltige Nahrung bzw. ZEA intravenös erhielten. Zearalanon wurde hingegen nicht detektiert. α -Zearalanol wird von Wiederkäuern aus den Substanzen ZEA und α -Zearalenol gebildet, nicht aber aus β -Zearalenol. Dies wurde in einem Fütterungsversuch getestet, indem anschließend die Galle der Rinder auf die Substanz α -Zearalanol, welche auch in der EU vor 1988 noch als

2. SCHRIFTTUM

Wachstumsförderer eingesetzt wurde, untersucht wurde (KENNEDY et al., 1998). Auch MEYER et al. (2002) entdeckten α -Zearalanol in der Gallenflüssigkeit von Rindern.

Ziegen zeigen ein ähnliches Metabolisierungsmuster. In Urin, Fäzes und Blutplasma wurden ZEA sowie α - und β -Zearalenol gefunden (freie, konjugierte und sulfatierte Formen), die anderen Metabolite (Zearalanon, α - und β - Zearalanol) hingegen nicht (DONG et al., 2010). Auch hier war β -Zearalenol der dominierende Metabolit.

Bei Menschen scheinen α - und β -Zearalenol die beiden Hauptmetaboliten zu sein. Mittels humaner Caco-2-Zelllinien wurde der Metabolismus von ZEA von VIDEMANN et al. (2008) erforscht. Im Gegensatz zu α -Zearalenol (40,7 %) und β -Zearalenol (31,9 %) wurden glucuronidierte Formen von ZEA (8,2 %) und von α -Zearalenol (19,1 %) seltener gefunden. MIROCHA et al. (1981) benennen ZEA und α -Zearalenol als die Hauptmetaboliten des Menschen, gefolgt von β -Zearalenol; alle kamen in glucuronidierter Form vor. Die humane Leber und intestinale Mikrosomen-Präparationen wandeln ZEA und seine Metaboliten in die glucuronidierten Formen um (PFEIFFER et al., 2010). MASSART et al. (2008) finden in menschlichem Blutserum ZEA und α -Zearalenol.

Die verschiedenen ZEA-Metaboliten weisen unterschiedliche Stärken der östrogenen Wirksamkeit auf. α -Zearalenol wirkt dabei am stärksten, gefolgt von ZEA. Die schwächste östrogene Aktivität besitzt β -Zearalenol. Folglich kann man die Spezies-spezifische Umwandlungsrate zu α -Zearalenol als Bioaktivierungsreaktion betrachten; die Umwandlung zu β -Zearalenol dementsprechend als eine Inaktivierungsreaktion (MALEKINEJAD et al., 2006). Dies erklärt die Sensibilität des Schweines und die höhere Resistenz von Rindern gegen die östrogenen Eigenschaften von ZEA.

Die Stärke der zytotoxischen Eigenschaften von ZEA und seinen Metaboliten scheint allerdings anders verteilt zu sein. Es wurde festgestellt, dass β -Zearalenol stärker zytotoxisch wirkt als α -Zearalenol, beide jedoch weniger zytotoxisch als ZEA (ABID-ESSEFI et al., 2009).

2.6 Carry over von ZEA

Im Muskelgewebe (Rückenmuskulatur) von Schweinen kann es zu einer Anreicherung von ZEA und seinen Metaboliten kommen. So konnten dort α -Zearalenol, α -Zearalanol und in geringen Mengen auch Zearalenon und β -Zearalanol nachgewiesen werden (ZÖLLNER et al., 2002). Im Muskelgewebe von Rindern hingegen waren jedoch keine ZEA-Metaboliten nachweisbar (KLEINOVA et al., 2002; MIROCHA, 1981). Auch freies ZEA wurde dort nur in geringen Mengen detektiert (MIROCHA, 1981).

Bei Truthähnen, welche eine ZEA-haltige Diät bekamen, wurden weder im Serum, in der Leber noch in der Brustmuskulatur ZEA oder seine Metaboliten gefunden (DÄNICKE et al., 2007b). Ein Übergang von ZEA in Hühnereier war ebenfalls nicht festzustellen (DÄNICKE et al., 2001; SYPECKA et al., 2004).

Verschiedene Studien zur Metabolisierung von ZEA bei Milchkühen ergaben, dass ZEA und seine Analoga in der Milch zwar ausgeschieden werden können, jedoch in toxikologisch nicht relevanten Mengen. MIROCHA et al. (1981) fanden freie und konjugierte Formen von ZEA (35 %), α -Zearalenol (31 %) und β -Zearalenol (34 %). Es wurde dazu bei einem Fütterungsversuch über sieben Tage 25 mg/kg ZEA verfüttert. Dabei fanden sich 1,4 mg/l ZEA und seine Metabolite in der Milch wieder. Folglich wurde eine carry over Rate von 0,7 % angenommen. In einer anderen Studie fanden sich jedoch nur 6 μ g/kg ZEA in der Milch, wobei 545 mg ZEA/Tag über 21 Tage verfüttert wurde (PRELUSKY et al., 1990). USLEBER et al. (1992) fanden in Milch 0,4 μ g/kg bzw. 1,2 μ g/kg ZEA; den Kühen wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen 25 mg bzw. 100 mg ZEA verabreicht. Auch HAGLER et al. (1980) detektierten Spuren von ZEA und β -Zearalenol in der Milch von Kühen und Schafen. SHREEVE et al. (1979) konnten hingegen bei Kühen, welche eine Diät mit 385-1925 μ g/kg enthaltenem ZEA erhielten, keinen Übergang von ZEA in die Milch feststellen. Bei den Forschungen von SEELING et al. (2005) lagen die Werte von ZEA und den Analoga in Milch ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze.

Entgegen dieser früheren Berichte wurde jedoch im Rahmen des SCOOP-Projektes „Fusarientoxine“ (2003) aus Großbritannien eine leicht höhere Belastung von Konsummilch mit ZEA festgestellt. So enthielten 3 % der untersuchten Proben ZEA mit Konzentrationen von 1,2-5,5 μ g/l. ZEA-Analoga fanden sich etwa gleich häufig in Milch; diese Konzentrationen lagen zwischen 3,4 und 12,5 μ g/l. Diese Angaben stehen allerdings

etwas isoliert da und wurden bisher nicht von anderen Untersuchungen bestätigt. Im Gegenteil, in Konsummilch des deutschen Marktes ($n = 128$) konnte kein ZEA nachgewiesen werden (KAPPENSTEIN et al., 2005a).

2.7 Analytik von ZEA

2.7.1 Extraktion und Aufreinigung

Spezielle problemspezifische Extraktionsverfahren wurden für die Extraktion von ZEA aus unterschiedlichen Matrices entwickelt. Grundsätzlich hat es sich aber bewährt, Gemische aus organischen Lösungsmitteln (Methanol, Acetonitril, Ethylacetat, Chloroform und Aceton) mit Wasser oder sauren Puffersystemen zu verwenden, da ZEA sehr unpolar ist (KRSKA und JOSEPHS, 2001). Meistens wird ZEA in Acetonitril/Wasser (60:40 – 90:10, v/v) (BRENN-STRUCKHOFOVA et al., 2009; DE SAEGER et al., 2003; KRSKA, 1998; SILVA und VARGAS, 2001) oder Methanol/Wasser (50:50 – 80:20, v/v) (DE SAEGER et al., 2003; LIU et al., 1985; THONGRUSSAMEE et al., 2008; USLEBER et al., 1992) extrahiert.

Als Aufreinigungsverfahren wurden Flüssig-Flüssig-Partitionierung, Festphasenextraktion (solid phase extraction, kurz SPE) oder die Reinigung mittels Immunaффinitätssäulen (immunoaffinity columns, kurz IAC) beschrieben. Bei der Flüssig-Flüssig-Partitionierung wird die unterschiedliche Löslichkeit von Stoffen in zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln genutzt. Eine hydrophile Phase und eine hydrophobe organische Phase werden als Lösungsmittel verwendet. Durch Schütteln der Lösung kommt es zur Vergrößerung der Phasengrenze zwischen den beiden Lösungsmitteln und damit zu einer besseren Extraktion der Komponente in die andere Phase. Nachdem sich im Ruhezustand wieder zwei Phasen ausbilden, ist der Analyt in einer der beiden Phasen angereichert. Flüssig-Flüssig-Partitionierungen von ZEA werden vor allem mit Dichlormethan vorgenommen (BAGNERIS et al., 1986; BENNETT et al., 1985). Eine Festphasenextraktion wird häufig mittels C-18-Kartuschen durchgeführt. Dabei werden eine oder mehrere Komponenten aus einer flüssigen/mobilen Phase (Probenextrakt) auf eine stationäre Phase gebracht und der Analyt dort angereichert bzw. aufkonzentriert, um anschließend wieder eluiert zu werden. Die gebräuchlichste Methode der Festphasenextraktion ist die Umkehrphasenchromatographie (reverse phase

chromatography, kurz RP) (ENGELHARDT, 1986; LINDSAY, 1996; www.sigmaaldrich.com). Dabei werden die Analyten zunächst durch verschiedene Wechselwirkungen (Dispersionskräfte, Van-der-Waals-Kräfte) in der Extraktionssäule angereichert und zurück gehalten. Nach einem Waschschrift werden durch ein starkes Lösungsmittel die Analyten von der Säule gelöst. Häufig werden Kieselgel, Octadecylsilan (mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert), Aluminiumoxid, Florisil (Magnesiumsilikat) oder Aktivkohle als stationäre Phase verwendet.

Weiterhin kann zwischen Normalphasen- und Ionenaustauschphasenchromatographie unterschieden werden (GALENSA et al., 1995). Bei der Normalphasenchromatographie werden nicht-polare Lösungsmittel auf eine polare Oberfläche der stationären Phase aufgebracht. Hier wirken adsorbtive Kräfte; unter anderem Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen usw. Bei der Ionenaustauschphasenchromatographie kann zwischen Kationen- und Anionenaustauscher unterschieden werden. Auf der stationären Phase befinden sich chemisch veränderte Polystyrolkugeln mit elektrisch geladenen Oberflächengruppen. Eine positive Matrix kann somit Makromoleküle mit negativer Ladung festhalten. Durch pH-Wert-Änderungen wechseln die Ladungen, das gebundene Molekül kann dann den Austauscher verlassen. (DEAN, 2009; LINNEMANN und KÜHL, 2005)

Die Vorteile der Festphasenextraktion gegenüber der Flüssig-Flüssig-Partitionierung sind einfache Handhabung, Schnelligkeit, sehr geringe Mengen an organischen Lösungsmitteln und damit hohe Anreicherungsfaktoren. An ihre Grenzen stößt die SPE allerdings bei extrem polaren, gut wasserlöslichen Analyten. Mycosep-Säulen, welche speziell für Mykotoxine entwickelt worden sind, stellen eine Mischung aus verschiedenen Medien dar und bieten eine gute Reinigungswirkung und Wiederfindung (BASSEN und THIELERT, 2000). Sie kommen auch in der Analytik von ZEA zum Einsatz (SILVA und VARGAS, 2001).

Die Aufarbeitung mit Immunaффinitätssäulen (immunoaffinity column, IAC) zeichnet sich aufgrund der spezifischen Antikörper durch eine hohe Selektivität aus, die insbesondere bei komplexen Untersuchungsmaterialien zu sehr sauberen Extrakten führt (MÜCKE und LEMMEN, 2004). Grundlage dieses Prinzips bilden spezifische reversible Wechselwirkungen zwischen Antigen (hier ZEA) und Antikörper (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Die Antikörper liegen immobilisiert auf einer Gelmembran auf. Beim

Durchlaufen der Lösungen bzw. Extrakte binden ausschließlich die Antigene an die Antikörper. Alle anderen Komponenten passieren das Säulenbett ohne Effekte. Es muss hierbei darauf geachtet werden, dass das Lösungsmittel einen pH-Wert aufweist, durch den die Antikörper nicht frühzeitig denaturiert werden. Durch einen Waschschrift werden störende Komponenten entfernt und anschließend der Analyt wieder freigegeben, indem ein Lösungsmittel verwendet wird, durch welches die Antikörper denaturieren (ECKARDT, 2010; KRSKA und MOLINELLI, 2007). Verschiedene Säulen speziell für ZEA sind kommerziell erhältlich. Vorteile sind vor allem die hohe Sensitivität sowie eine gute Automatisierbarkeit der Methode. Nachteilig ist allerdings der relativ hohe Preis der Säulen und die Qualitätsschwankungen (Güte der Antikörper) (BASSEN und THIELERT, 2000).

Eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Extraktions- und Reinigungsverfahren für ZEA ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Extraktions- und Aufreinigungsverfahren für ZEA aus verschiedenen Probenmaterialien

Toxin	Probenmaterial	Extraktion	Aufreinigung des Rohextrakts (Säulenmaterial, Elutionsmittel)			Messverfahren	Referenz
		Extraktionsmittel	Vol. (ml)	Dauer (min)			
ZEA	Mais (25 g)	Acetonitril/Wasser 75:25 (v/v)	100	3	Immunaффinitätssäule (Rhône diagnostic technologies), eluieren mit Acetonitril, abdampfen, lösen in Acetonitril/Wasser 40:60 (v/v)	HPLC-FLD	KRSKA, 1998
ZEA	Mais, Weizen, Gerste, Hafer (25 g)	Acetonitril/Wasser 75:25 (v/v)	100	k. A.	1. Festphasenextraktionssäule (Kieselgel, Phenomenox), eluieren mit 1,25 ml Ammoniumacetat in Methanol/Wasser 70:40 (v/v) 2. Immunaффinitätssäule (Vicom), eluieren mit Methanol	HPLC-MS-MS	ZÖLLNER et al., 1999
ZEA	Mais (25 g)	Acetonitril/Wasser 84:16 (v/v)	100	5	Mycosep-224 Säule (Romer Labs), abdampfen, lösen in Methanol/Wasser 80:20 (v/v)	HPLC-FLD	SILVA und VARGAS, 2001
ZEA	Mais (25 g)	Methanol/Wasser 50:50 (v/v)	100	30	1. C-18 Festphasenextraktionssäule eluieren mit Methanol	HPLC-FLD	DE SAEGER et al., 2003
	Mais (20 g)	Acetonitril/Wasser 90:10 (v/v)	50	30	2. Florisil, eluieren mit Methanol ZearalaTest-Säule, eluieren mit Methanol		
ZEA und ZEA-Analoga, andere Mykotoxine	Milch (5 g)	Acetonitril/Hexan 62:38 (v/v)	26	10	Festphasenextraktionssäule (Oasis HLB), eluieren mit Methanol	LC-ESI-MS/MS	SORENSEN und ELBAEK, 2005
ZEA, DON	Weizen (5 g)	Acetonitril/Wasser 60:40 (v/v)	20	60	Sol-Gel-Säule, eluieren mit Acetonitril/Wasser 50:50 (v/v)	HPLC	BRENN-STRUCK-HOFOVA et al., 2009

2.7.2 Biologische Nachweisverfahren

Zellkulturtests als biologische Nachweisverfahren sind generell wenig geeignet für den Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln, da sie zu unspezifisch sind. WINTER et al. (2008) beispielsweise entwickelten einen *in vitro* Bioassay mit einem Reporter-gen als Indikator, welcher auf humanen embryonalen Nierenzellen basiert und Luciferase produziert, um östrogene Substanzen in Schweinefutter nachzuweisen. Über Rezeptoren wird die östrogene Aktivität mithilfe von Luciferase-Substrat in Östradiol-Äquivalenten (EEC) gemessen und anschließend mit den Ergebnissen der HPLC-UV Untersuchungen verglichen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Hefe-Bio-Nachweise entwickelt. MITTERBAUER et al. (2003) benutzten als Indikator den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm YZRM7, welcher nur durch die Aktivierung eines Pyrimidin-Biosynthese-Gens wachsen kann. Dieses Gen wird, unter der Voraussetzung, dass exogene östrogene Substanzen (ZEA beispielsweise) vorhanden sind, durch humane Östrogenrezeptoren exprimiert. Diese Methode ist kostengünstig und ohne weitere Aufreinigungsschritte durchführbar. Allerdings wird nicht spezifisch ZEA nachgewiesen, sondern andere östrogene Substanzen werden miterfasst, wodurch theoretisch falsch-positive Ergebnisse resultieren können. Auch VÄLIMAA et al. (2010) benutzen als Indikator *Saccharomyces cerevisiae*. Herangezogen wurde der Stamm BMAEReluc/Er α , welcher ein genetisch modifizierter biolumineszierender Ganzzell-Biosensor für den Nachweis von ZEA und seinen Analoga in Milch und Milchprodukten darstellt. In Anwesenheit von östrogenartig wirkenden Komponenten produziert dieser Stamm das Enzym Luciferase. In einem System, welches mit D-Luciferin Substrat versehen ist, wird durch die enzymatische Reaktion Licht ausgestrahlt. Vorteilig hierbei sind die kurze Dauer des Nachweises sowie die mögliche Automatisierbarkeit.

2.7.3 Physikalisch-chemische Nachweisverfahren

2.7.3.1 Dünnschichtchromatographie

Unter Chromatographie versteht man physikalische Methoden, bei denen eine Stofftrennung durch Verteilung von Substanzen zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt. Die Dünnschichtchromatographie (DC;

thin layer chromatography, TLC) ist ein Verfahren der Flüssigchromatographie, das in einem offenen System stattfindet. Dieses Verfahren wurde schon sehr früh entwickelt und war schon bekannt, als die ersten analytischen Methoden zur Detektion von Mykotoxinen entwickelt wurden, sodass es auch zu diesem Zweck angewandt wurde. Trotz der Weiterentwicklung der instrumentalen Möglichkeiten wird die DC noch immer verwendet; vor allem in Laboratorien in Entwicklungsländern zur Detektion von Aflatoxinen (SHEPHARD, 2008).

Die Trennung von Stoffen erfolgt aus einer flüssigen Phase heraus an eine Festphase. Als Festphasen werden zum Beispiel Kieselgel oder Aluminiumoxid benutzt. Das Fließmittel wird in der DC allein durch Kapillarkräfte durch die Sorbensschicht bewegt und transportiert die Substanzen des Analytgemisches mit sich. Die Art des Fließmittels hängt von der Polarität der zu trennenden Substanzen ab. Die Detektion erfolgt entweder anhand der Eigenfarbe des Toxins oder durch Einsatz von Fluoreszenzzusätzen sowie UV-Licht oder aber nach Derivatisierung. ZEA beispielsweise zeigt unter kurzwelligem UV-Licht (256 nm) eine grünlich-blaue Eigenfluoreszenz. Nach Derivatisierung mit Aluminiumchlorspray (fünf Minuten bei 130 °C) wird die Fluoreszenz blau und kann unter langwelligem UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht werden (SHEPHARD, 2008).

Ein Vorteil der DC ist, dass eine große Anzahl an Proben gleichzeitig untersucht werden kann. Außerdem ist die Durchführung schnell und kostengünstig (MAJERUS und WOLLER, 1984). Weiterhin eignet sich diese Methode vor allem gut als Screening-Test (SHEPHARD, 2008). Nachteile der DC sind die oft geringe Sensitivität und Selektivität. So wurden in einer internationalen Laborvergleichsstudie bei Anwendung der DC deutlich niedrigere ZEA-Konzentrationen ermittelt als bei Durchführungen der Untersuchungen mit anderen Nachweismethoden (JOSEPHS et al., 2001).

Einige Anwendungen mittels DC zur Detektion von ZEA sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 5: Anwendung dünnschichtchromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA (alle Methoden verwenden Kieselgel als stationäre Phase)

Toxin	Probenmaterial	Mobile Phase	Derivatisierung	R _F -Wert	NWG (ng/g)	Referenz
ZEA	Getreide, Lebensmittel	1. Chloroform/Methanol, 93/7 2. Toluol/Aceton/Methanol, 5/3/2	Unter UV-Licht betrachten	0,6 0,8	50	KAMI-MURA et al., 1981
ZEA	Getreide, Lebensmittel	k. A.			300	RICHARD et al., 1993
ZEA	Mais, Getreide	Chloroform/Methanol, 98/2	UV-Licht (254 nm; 365 nm)	k. A.		SCHAAF-SMA et al., 1998
ZEA	Polenta, Cornflakes	Toluol/Acetonitril, 95/2	UV-Licht (254 nm)	k. A.	50	SOLOVEY et al., 1999
ZEA	Mais	Ethanol/Chloroform, 3,5/96,5	UV-Licht (254 nm)	0,61-0,7	100	HADIANI et al., 2003
ZEA	Geflügelfutter	Chloroform/Aceton, 90/10	UV-Licht (254nm; 365 nm)	k. A.	100	OLIVEIRA et al., 2006
ZEA	Getreide, Tierfutter	Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure, 5/4/1	UV-Licht (366 nm)	k. A.	250	SEGVIC KLARIC et al., 2009
ZEA	Malz, Schlempe	Chloroform/Aceton, 90/10	UV-Licht (254 nm, 365 nm)	k. A.	100	GONZALEZ PEREYRA et al., 2011
ZEA	Reis	Dichlormethan/Aceton, 9/1	Unter UV-Licht betrachten	25 65	100	MAKUN et al., 2011

k. A.: keine Angabe, *NWG*: Nachweisgrenze, *R_F-Wert*: Retentionsfaktor

2.7.3.2 Flüssigkeitschromatographie (LC), Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)

Bei der Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography, LC) wird ein Substanzgemisch einer Probe in einem flüssigen Lösungsmittel gelöst und mit einem Eluenten (Flüssigkeit = mobile Phase) über eine stationäre Phase (Säule oder planare Schicht) geschickt. Die Stoffe werden in der flüssigen Phase aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität getrennt. Polare Moleküle werden in einer unpolaren Säule am

wenigsten gebunden und verlassen die Säule zuerst, unpolare Moleküle verlassen die Säule zuletzt. Dadurch findet die Trennung statt. Während der Trennung wird häufig ein Gradient gefahren, d. h. die Zusammensetzung der Fließmittel wird verändert. Dadurch kann die Laufzeit verkürzt und/oder die Trennleistung gesteigert werden (ECKARDT, 2010; ENGELHARDT, 1986).

Die Gelpermeationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) genannt, ist eine Art der Flüssigchromatographie. Dabei werden Moleküle gelöster Stoffe aufgrund ihrer Größe (ihrem hydrodynamischen Volumen) getrennt. Der Trennungseffekt beruht auf unterschiedlichen Diffusionsvolumina für die verschiedenen gelösten Moleküle. Für die kleineren Moleküle vergrößert sich das ihnen zur Verfügung stehende Diffusionsvolumen dadurch, dass sie in die porösen Polymere der stationären Phase (verschiedene Gele oder poröses Glas) eindringen können. Dadurch verlängert sich die Retentionszeit. Größere Moleküle werden demnach weniger stark zurück gehalten und verlassen die Säule schneller. Die wesentlichen Bestandteile eines GPC-Systems sind Pumpe, Injektionssystem, Trennsäulen und verschiedene Detektoren. Die ermittelten Konzentrationen werden als Funktion der Zeit oder des Volumens über die Brechzahl (Differentialfraktiometer) oder über UV-Detektoren registriert (DIN-TERM, 2001). Die GPC spielt vor allem beim Nachweis von Mykotoxinen in Ölen eine gewisse Rolle, vor allem in der Probenvorbereitung (KAPPENSTEIN et al., 2005b).

Eine Weiterentwicklung der Säulenchromatographie ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). Ein Substanzgemisch in einem flüssigen Lösungsmittel wird zum Auftrennen der Eluenten durch eine stationäre Phase transportiert, an welche ein Pumpensystem angeschlossen ist. Dies ist notwendig, um die erforderlichen hohen Drücke zu erreichen. Als mobile Phasen für ZEA kommen beispielsweise Acetonitril/Wasser (50:50, v/v) (DE SAEGER et al., 2003) oder Methanol/Acetonitril/Wasser (1:1,6:2, v/v) (BENNETT et al., 1985) infrage. Die Detektion von Mykotoxinen in der HPLC kann mittels UV-Detektion oder mittels Fluoreszenzdetektion erfolgen. Jede Substanz hat eine charakteristische Retentionszeit, welche durch die verschiedenen Absorptions- und Verteilungskräfte zustande kommt. Durch den Vergleich der Retentionszeiten der Toxine mit denen der Standardtoxine erfolgt die Qualifizierung. Die Quantifizierung erfolgt durch Berechnung der Peakhöhe oder der Peakfläche (ENGELHARDT, 1986). Vorteilig gegenüber der DC sind die Schnelligkeit

der HPLC und die Möglichkeit der Automatisierung. Außerdem verringern sich der Variationskoeffizient und die Nachweisgrenze deutlich (MAJERUS und WOLLER, 1984).

Mittlerweile wird die Detektion von ZEA in Probenextrakten immer häufiger mittels Massenspektrometrie (mass spectrometry, MS) durchgeführt, vor allem als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) (REN et al., 2007; SORENSEN und ELBAEK, 2005; VENDL et al., 2009). Die Quantifizierung von Verbindungen wird bei der MS von ZEA dadurch erleichtert, dass bei der Analytik isotopenmarkierte interne Standards verwendet werden können. So entwickelten CRAMER et al. (2007) eine HPLC-MS/MS Methode, bei der 3,5- d_2 -Zearalenone als interner Standard verwendet wurde.

Bei der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen MS. Dabei werden mehrere Analysatoren hintereinander geschaltet und dadurch die Sensitivität und die Selektivität erhöht. Das Problem der klassischen MS beim Einsatz in der Analytik besteht darin, dass chemisch unterschiedliche, aber massengleiche Teilchen simultan detektiert werden und ein gemeinsames Signal ergeben. Um die erforderliche Spezifität für quantitative Analysen zu gewinnen, ist daher eine Vortrennung nötig, die in der Regel durch ein vorgeschaltetes chromatographisches Verfahren erfolgt. Bei der Tandem-Massenspektrometrie wird die erforderliche analytische Spezifität durch die Kombination zweier massenspektrometrischer Einheiten erreicht. Dabei wird in der ersten Einheit nach einer definierten Masse selektiert. In einer nachgeschalteten Kollisionszelle zerfallen sie aufgrund der Stoßenergie, welche durch die Kollision mit einem Inertgas entsteht, in spezifische Bruchstücke. Die entstandenen Ionenfragmente werden in der zweiten analytischen Einheit getrennt und anschließend detektiert. Durch die massenspezifische Selektion und den molekültypischen Zerfall entfällt die Notwendigkeit einer Vortrennung. Das Verfahren erlaubt daher einen hohen Probendurchsatz (ECKARDT, 2010; VOGESER und PARHOFER, 2007).

In Tabelle 6 und in Tabelle 7 sind nachfolgend einige Anwendungen hochdruckflüssigkeitschromatographischer- bzw. flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von ZEA zusammengefasst.

Tabelle 6: Anwendung hochdruckflüssigkeitschromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA

Proben	Methode	Stationäre Phase (Säule, mittl. Partikel Ø)	Mobile Phase	Fluß ml/min	t _R (min)	Quant., Wellenl. (nm)	NW/G (ng/g)	WFR (%)	Referenz
Mais	HPLC	Zorbax Reverse Phase C ₈ oder C ₁₈	Methanol/ Acetonitril/Wasser (1:1,6:2)	2	5,5	FLD: λ _{ex} variabel λ _{em} = 418	k. A.	77,8-123	BENNETT et al., 1985
Kakaobohnen	HPLC	I.D. C ₁₈ (10 cm x 8 mm) Ø 5 µm	Hexan/Propanol/ Ameisensäure (95:3:2)	2,0-4,0	k. A.	λ _{ex} = 245 λ _{em} = 280	1-1,5	75-94,2	HURST et al., 1987
<i>F. graminearum</i> Kulturen	HPLC-FLD	RP µBondapak C ₁₈ (150 x 3,9 mm) Ø 10 µm	Acetonitril/Wasser (55:45)	1	k. A.	λ _{ex} = 274 λ _{em} = 440	5 ng/20 µl	85,37-100,97	MERINO et al., 1993
Lebensmittel aller Art	HPLC	Vorsäule, RP-18 (250 x 4,6 mm)	Acetonitril/ Wasser/Essigsäure (99:99:2)	1	k. A.	λ _{ex} = 270 λ _{em} = 446	2,5-5,0	k. A.	BASSEN und THIE- LERT, 2000
Mais	HPLC-FLD	Shimadzu C ₁₈ (250 x 4,6 mm) Ø 5 µm	Methanol/Wasser (80:20)	0,5	12- 13,0	λ _{ex} = 280 λ _{em} = 465	3,6	81,4-107	SILVA und VARGAS, 2001
Mais	HPLC-FLD u. HPLC-UV	LiChrospher 100 C ₁₈ RP (250 x 4 mm) Ø 5 µm	Methanol/Wasser (65:35)	1	~5	λ _{ex} = 274 λ _{em} = 444 Photodiode: 236	4,0-30,0	82,3-117,6	MATEO et al., 2002

Fortsetzung Tabelle 6:

Proben	Methode	Stationäre Phase (Säule, mittl. Partikel Ø)	Mobile Phase	Fluß ml/min	t _R (min)	Quant., Wellenl. (nm)	NWG (ng/g)	WFR (%)	Referenz
Mais, Tierfutter	RP-HPLC-FLD	Supelco Discovery C ₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Ø 5 µm	Acetonitril/Wasser (50:50)	1	~11	λ _{ex} = 274 λ _{em} = 440	k. A.	89-110	DE SAEGER et al., 2003
Lebensmittel aller Art	HPLC-FLD u. HPLC-UV	k. A.				λ _{ex} = 235 λ _{em} = 450 Photodiode: 280	1	65-101	SCHOLLENBERGER et al., 2005
Weizen	HPLC-FLD	Eurospher 100 RP ₁₈ (250 x 4 mm) Ø 5 µm	Acetonitril/Wasser (60:40)	1	k. A.	λ _{ex} = 271 λ _{em} = 452	4	88	NEUHOF et al., 2008
Weizen, Weizenprodukte	HPLC-FLD	ACE 111-1502 C ₁₈ RP (150 x 3 mm) Ø 3 µm	Acetonitril/Wasser (45:55)	0,2	~12	λ _{ex} = 330 λ _{em} = 460	2	82-112	BRENN-STRUCK-HOFOVA et al., 2009
Huhn	HPLC	Hypersil Gold C ₁₈ (150 x 4,6 mm)	Ammoniumacetat/ Acetonitril/Methanol (45:8:47)	1	~11	k. A.	30	k. A.	DUCA et al., 2009
Mais	HPLC-UV	Dionex C ₁₈ (150 x 4,6 mm) Ø 3 µm	PBS/Acetonitril/ Methanol (versch. Konz.)	1	14,9	UV 236	14,4	38,21	CURTI-CAPEAN et al., 2011

k. A.: keine Angabe; NWG: Nachweisgrenze, WFR: Wiederfindungsrate, t_R: Retentionszeit; Quant.: Quantifizierung, Wellenl.: Wellenlänge, FLD: Fluoreszenzdetektion

Tabelle 7: Anwendung flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von ZEA

Proben	Clean-up	Kopplungs- methode	Ionisations- modus	Funktionsweise	Standard	NWG	Quantifizie- rungsgrenze	Referenz
Getreide	Phenomenex RP ₁₈ ; Vicam Immunaффinitätssäulen	APCI	Neg	MRM	Zearalanon	0,5 ng/g	1 ng/g	ZÖLLNER et al., 1999
Urin	C ₁₈ SPE; NH ₂	ESI	Neg	MRM	D4- Zearalanon; D4-Taleranol	0,03 ng/ml	<1,0 ng/ml	VAN BENNEKOM et al., 2002
Mais, Weizen	-	ESI	Neg	Full Scan	Zearalanon	4-5 ng/g	12-15 ng/g	PALLARONI et al., 2003
Mais, Weizen	-	ESI	Neg	MRM	-	0,03- 30 µg/kg	-	BERTHILLER et al., 2007
versch. Lebensmittel	Immunaффinitäts- säulen	ESI; APCI	Neg/Pos	SIM	-	-	-	SENYUYA et al., 2008
Getreide	-	ESI	Neg	MRM	matrix- abhängig	20- 55 µg/kg	40-110 µg/kg	KOKKONEN und JESTOI, 2009
Mais, Weizen	-	APPI	Neg	Full Scan; MRM	-	5 µg/kg	6 µg/kg	CAPRIOTTI et al., 2010
Frühstückszerealien, Babynahrung	DZT Immunaффinitätssäulen	ESI	Neg	MRM	-	10 µg/kg	-	ROMAGNOLI et al., 2010
Getreide	Vikam AOZ Immunaффinitätssäulen	ESI	Neg	SRM	-	1 µg/kg	2 µg/kg	LIAO et al., 2011

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; *APPI*: Atmospheric Pressure Photoionisation; *MRM*: Multi-Reaction Monitoring; *ESI*: Electrospray Ionisation; *SRM*: Selected Reaction Monitoring; *SIM*: Selected Ion Monitoring

2.7.3.3 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC), auch Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) genannt, dient als Analysenmethode zum Auftrennen von Gemischen in einzelne chemische Bestandteile. Die Trennung erfolgt hierbei in der gasförmigen Phase, wobei ein flüssiges Ausgangsgemisch für die Analyse verdampft wird. Somit ist die GC nur für Stoffe anwendbar, welche bereits gasförmig sind oder unzersetzt verdampfbar sind. Als mobile Phase wird ein Inertgas verwendet (z. B. Stickstoff oder Helium), welches durch eine Trennsäule gedrückt wird, die innen mit einer spezifischen stationären Phase ausgekleidet ist. Vor der eigentlichen Untersuchung, nach der Reinigung der Extrakte, erfolgt für fast alle Stoffe eine Derivatisierung. Danach werden die Proben über bestimmte Temperaturprogramme in ihren gasförmigen Zustand überführt und mittels Detektoren analysiert. Abhängig von Polarität und Dampfdruck der einzelnen Moleküle verweilen diese unterschiedlich lange an der stationären Phase. Ihr Austrittszeitpunkt wird von dem Detektor erfasst und die Menge graphisch dargestellt, indem sie mit Standardsubstanzen verglichen wird. Die wichtigsten Kenngrößen der Säulen sind der Säulendurchmesser und die Säulenlänge. Verschiedene Detektoren, wie Flammenionisations- (FID), Stickstoff/Phosphor- (NPD), Photoionisations- (PID) oder Elektroneneinfangdetektoren (ECD) können eingesetzt werden. Ebenso kann die Massenspektrometrie (MS) (vgl. Kap. 2.7.3.2) als Detektor dienen (BAUGH, 1997; KOLB, 2003).

Die GC wurde und wird noch immer auch zur Analytik von ZEA in verschiedenen Matrices benutzt. Seit der Verbreitung der LC-MS/MS ist die praktische Untersuchung von ZEA mittels GC allerdings stark zurückgegangen.

Nachfolgend sind einige Untersuchungen mittels GC dargestellt (Tabelle 8).

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 8: Anwendung gaschromatographischer Methoden zum Nachweis von ZEA

Derivatisierungsreagenz	Probenmaterial	Detektion	WFR (%)	NWG	Referenz
TMS; BSTFA	Getreide	ITD	82-86	1 µg/kg	SCHWADORF und MÜLLER, 1992
TMS	Getreide	MS	89,1-99,5	5 ng/g	TANAKA et al., 2000
1.) BSTFA + 1 % TMCS 2.) MSTFA 3.) TMSDEA 4.) BSA + TMCS + TMSI (3:2:3)	Sedimente	MS	-	0,13-3,57 ng/g	KINANI et al., 2008

BSA: Bis(trimethylsilyl)-Acetamid; *BSTFA*: *N,O*-bis(trimethylsilyl)-Trifluoracetamid; *ITD*: Ion trap detector; *MSTFA*: *N*-Methyl-*N*-Trimethylsilyltrifluor-Acetamid; *TMS*: Trimethylsilylimidazol; *TMCS*: Trimethylchlorsilan; *TMSDEA*: *N,N*-Diethyltrimethyl-Silylamin; *TMSI*: *N*-Trimethylsilylimidazol;

2.7.4 Immunologische Verfahren

In den letzten Jahren wurden durch das wachsende Interesse der Analytik nach schnellen, kostengünstigen und sensitiven Nachweisverfahren zahlreiche immunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen entwickelt. Mehrere kommerzielle Anbieter haben Immuntests für ZEA in Lebens- und Futtermitteln in ihrem Programm. Der grundsätzliche Vorteil immunologischer Nachweisverfahren (Abbildung 3) liegt zudem in der Möglichkeit der Automatisierung, wodurch ein hoher Probendurchsatz erzielt werden kann. Zudem ist ihr apparativer Aufwand im Gegensatz zu chemisch-physikalischen Verfahren geringer, weshalb sie sich besser als Screening-Methoden eignen. Jedoch werden sie auch vielmehr zur quantitativen Bestimmung herangezogen. Der Nachweis einer Substanz wird dabei über spezifische Antikörper geführt. Das Ergebnis wurde in den 70er und 80er Jahren hauptsächlich über radioaktiv markierte Substanzen sichtbar gemacht (Radio Immunoassay, RIA). Zur Markierung wurden dabei die β -Strahler ^3H und ^{14}C verwendet. Aufgrund der sicherheitstechnischen Problematik und der Entsorgung der Isotope stehen aber mittlerweile Enzymimmuntests deutlich im Vordergrund (Enzyme Immunoassay, EIA).

2. SCHRIFTTUM

Der ursprüngliche Begriff ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) wurde von ENGVALL und PERLMANN (1971) geprägt; er wird aber oft durch den allgemeineren Begriff EIA (Enzyme Immunoassay) ersetzt.

Grundsätzlich kann man EIAs in kompetitive und nicht kompetitive Verfahren einteilen (siehe Abbildung 3). Bei nicht kompetitiven Tests werden markierte Antikörper benutzt, welche im Überschuss zum Antigen vorliegen.

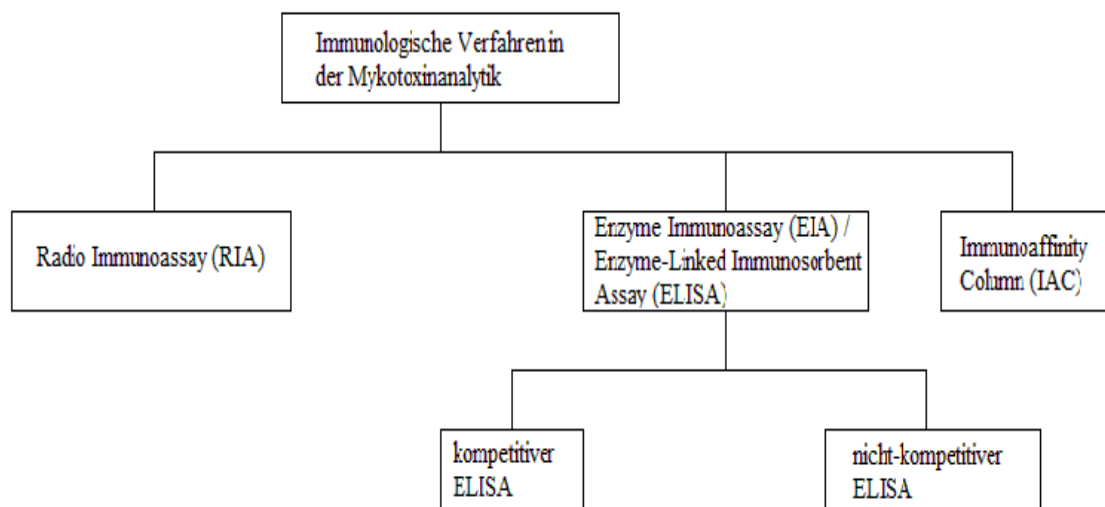


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Einteilung immunologischer Verfahren in der Mykotoxinanalytik

Mykotoxine sind niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht < 1000) und können deswegen nur im kompetitiven Testsystem nachgewiesen werden. Die Funktionsweise dieses Prinzips besteht aus einer Konkurrenz von freiem und markiertem Antigen um eine begrenzte Anzahl an Antikörperbindungsstellen. Um spezifische Antikörper gegen ZEA zu erhalten ist es notwendig, Toxin-Proteinkonjugate zu synthetisieren, um damit anschließend Kaninchen (BURKIN et al., 2002; LIU et al., 1985; USLEBER et al., 1992) oder Mäuse (DIETRICH et al., 1995; DIXON et al., 1987; TESHIMA et al., 1990; THONGRUSSAMEE et al., 2008) zu immunisieren.

Weiterhin kann man bei den kompetitiven EIAs, welche zum Nachweis von Mykotoxinen eingesetzt werden, zwischen direkten und indirekten Verfahren unterscheiden.

Beim **kompetitiven direkten EIA** sind die Antikörper direkt oder über Anti-Ig-Antikörper (Doppelantikörpertechnik, DASP) an ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dienen als Festphase. Freies und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit werden in einem Waschschrift die nicht gebundenen Reagenzien entfernt, bevor Substrat/Chromogen-Lösung zugegeben wird. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, umso weniger enzymmarkiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Somit besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Substratumsatz durch das enzymgebundene markierte Antigen und der Menge an freiem Antigen in der Probe.

Beim **kompetitiven indirekten EIA** wird Antigen-Protein-Konjugat auf ein Trägermaterial (Mikrotiterplatte) gebunden und dient als Festkörperphase. Die Probe wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Dabei konkurrieren die freien Antigene der Probe mit denen der Festphase um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift (Entfernen ungebundener Reagenzien) wird enzymmarkierter Antikörper (gegen die Immunglobuline der Tierart, von welcher die spezifischen Antikörper stammen) hinzugefügt und nach ausreichender Inkubation und einem Waschschrift wird Substrat/Chromogen-Lösung zugegeben. Der Substratumsatz ist wiederum umgekehrt proportional zur freien Antigenmenge der Probe.

Zusätzlich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden sind mittlerweile einige kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis von ZEA erhältlich. Es werden dabei unterschiedliche Matrices berücksichtigt. Die Angaben zu Kreuzreaktionen variieren zwischen den einzelnen Anbietern stark. Die Nachweisgrenzen werden zwischen 0,25 µg/kg und 50 µg/kg angegeben.

In Tabelle 9 sind einige Untersuchungen auf ZEA mittels enzymimmunologischer Verfahren zusammengefasst.

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 9: Untersuchungen verschiedener Probenmaterialien auf ZEA unter der Verwendung enzymimmunologischer Verfahren

Probenmaterial	EIA-Methode	Kreuzreaktionen (%)	WFR (%)	NWG	Referenz
Mais, Weizen, Schweinefutter, Milch	indirekt	α -Zearalenol (50) β -Zearalenol (12) α -Zearalanol (6) β -Zearalanol (3)	k. A.	0,5-50 ng/ml	LIU et al., 1985
Mais	indirekt	ZEA (100) α -Zearalenol (107) β -Zearalenol (29) α -Zearalanol (35) β -Zearalanol (25)	99-112	0,5 ng/ml	DIXON et al., 1987
Gerste	indirekt	ZEA (100) α -Zearalenol (0,9) β -Zearalenol (0,1) Zearalanon (4,0) α -Zearalanol (0,1) β -Zearalanol (0,1)	102	0,3 ng/ml	TESHIMA et al., 1990
Weizen, Milch, Serum, Urin, Fäzes	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (37,3) β -Zearalenol (7,2) Zearalanon (59,2) α -Zearalanol (5,3) β -Zearalanol (3,9)	82,9-100,7	20 μ g/kg	USLEBER et al., 1992
k. A.	direkt	α -Zearalenol (133,7) β -Zearalenol (24,5) Zearalanon (182,7) α -Zearalanol (82,9) β -Zearalanol (74,1)	k. A.	0,07-0,2 ng/ml	DIETRICH et al., 1995
Lebensmittel auf Getreidebasis	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (37) β -Zearalenol (7,2) Zearalanon (60) α -Zearalanol (5,3) β -Zearalanol (3,9)	70-110	5 μ g/kg	USLEBER und MÄRTL-BAUER, 1998
Reis, Mais, Gerste	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (121,5) β -Zearalenol (65,3) α -Zearalanol (21,5) β -Zearalanol (18,9)	87-112	0,15 μ g/l	THON-GRUS-SAMEE et al., 2008

NWG: Nachweisgrenze; WFR: Wiederfindungsrate

2. SCHRIFTTUM

Fortsetzung Tabelle 9

Probenmaterial	EIA-Methode	Kreuzreaktionen (%)	WFR (%)	NWG	Referenz
Lebensmittel auf Getreidebasis, Milch	direkt	ZEA (100) α -Zearalenol (88) β -Zearalenol (44) Zearalanon (60) α -Zearalanol (53) β -Zearalanol (25)	86-129	6 $\mu\text{g/kg}$	SEIDLER, 2007
Futtermittel	direkt (ZEA-beschichtet)	ZEA (100) α -Zearalenol (108,1) β -Zearalenol (119,3) α -Zearalanol (114,1) β -Zearalanol (130,3)	106-123	10 $\mu\text{g/kg}$	CHA et al., 2012
	direkt (anti-ZEA-Antikörper)	ZEA (100) α -Zearalenol (100,7) β -Zearalenol (120,7) α -Zearalanol (121,6) β -Zearalanol (151,6)			
Mais und aus Mais verarbeitete Produkte	indirekt	ZEA (100) β -Zearalenol (24,1) α -Zearalanol (189,1) β -Zearalanol (43,9)	80-128	0,1 ng/g	PEI et al., 2013

2.8 Informationen über die untersuchten Produktgruppen

2.8.1 Pflanzliche Speiseöle

Öle sind nicht nur wichtige Energielieferanten, sondern spielen auch eine wesentliche Rolle bei der Konsistenz, der Farbe, der Wasserretention und beim Geschmack unserer Lebensmittel. Zudem dienen sie als Quelle für essentielle Fettsäuren und für die fettlöslichen Vitamine E (Tocopherole) und K sowie für Carotine und sekundäre Pflanzenstoffe. Viele von ihnen besitzen einen hohen Gehalt an einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (KOERBER et al., 2004; RIMBACH et al., 2010). Im Folgenden sind die wichtigsten Öle Deutschlands kurz erläutert:

- Erdnussöl ist ein schwach gelbes, mild riechendes Öl, das wegen seiner wenigen Begleitstoffe einen der besten Margarinegrundstoffe darstellt. Von den über 80 %

ungesättigten Fettsäuren enthält es bis zu 35 % Linolsäure. Charakteristisch ist der Gehalt an Arachin-, Behen- und Lignocerinsäure, welcher zur analytischen Erkennung von Erdnussöl herangezogen werden kann (KRIST, 2013).

- Olivenöl wird aus dem Fruchtfleisch oder den Kernen der im Mittelmeerraum wachsenden Oliven gewonnen. Oliven sind die Steinfrüchte des Ölbaums (*Olea europaea sativa*; Familie: *Oleaceae*) und gelten als eine der ältesten Ölquellen. Das Olivenöl enthält fast 80 % Ölsäure. Das Öl aus Fleisch und Kern unterscheidet sich nicht voneinander. Die Oliven werden im Allgemeinen zunächst kaltgepresst und im Anschluss einer Wärmepressung bei ca. 40 °C unterzogen (KRIST, 2013; RIMBACH et al., 2010). Am bedeutendsten unter den Olivenölen sind die nativen Olivenöle, welche durch mechanische Verfahren und Kaltpressung gewonnen werden (KRIST, 2013).

- Rapsöl wird in hydrierter Form häufig für die Margarineproduktion verwendet. Es wird aus *Brassica*-Arten gewonnen und liefert ein bräunliches Öl. Aus der Rapssaat kann entweder ein kaltgepresstes oder ein raffiniertes Rapsöl gewonnen werden (KRIST, 2013).

- Sojaöl ist ein wichtiger Margarinegrundstoff. Neben 35 % Protein enthält die Sojabohne 2–4 % Lecithin. Der Linolsäuregehalt unter den Fetten liegt bei bis zu 50 %. Hauptanbauggebiete sind die USA, China, Indien, Indonesien, Afrika, die Philippinen, Russland sowie Süd- und Mittelamerika. Sojaöl wird durch Extraktion und Raffination gewonnen. Die Öltröpfchen sind sehr fest in der Matrix verankert, was dazu führt, dass die Kaltpressung eine zu geringe Ausbeute liefert. Häufig ist Sojaöl Bestandteil von Mischölen (KRIST et al., 2013; RIMBACH et al., 2010).

- Sesamöl wird aus *Sesamum indicum* gewonnen, das hauptsächlich in China, Indien, Korea und der Türkei angebaut wird. Das Öl enthält 40-48 % Linolsäure, 8-10 % Palmitinsäure und 3–6 % Stearinsäure. Es ist aufgrund seiner hohen Gehalte an Antioxidantien (Tocopherole, Sesamol) relativ beständig gegen Oxidation (KRIST, 2013). Die gerösteten Sesam-Samen werden auch zum Aromatisieren von Backwaren verwendet (BALTES und MATTISEK, 2011).

- Getreidekeimöle (Mais-, Weizenkeimöl) werden durch Extrahieren bzw. Auspressen der Keimlinge gewonnen. Diese Öle sind wegen ihrer hohen Tocopherolgehalte diätetisch wertvoll. Vor allem Weizenkeimöl enthält bis zu 1,7 g Tocopherol/kg Öl (BALTES und MATTISEK, 2011).

- Sonnenblumenöl wird aus Sonnenblumen (*Helianthus annuus*; Familie: *Asteraceae*) hergestellt, welche vorwiegend in Ost-Europa angebaut werden. Für die Herstellung des Sonnenblumenöls werden die reifen Schließfrüchte (Sonnenblumenkerne) verwendet. Das Öl wird durch Kaltpressen oder Extrahieren veredelt. Sonnenblumenöl besitzt mit ca. 65 % einen der höchsten Linolsäuregehalte unter den Speiseölen. Das hellgelbe und milde Sonnenblumenöl (kaltgepresst) ist nach mechanischer Klärung zum direkten Verzehr geeignet. Raffiniertes Sonnenblumenöl eignet sich hingegen als Salat- und Bratöl sowie zur Margarineherstellung (KRIST, 2013; RIMBACH et al., 2010).

2.8.1.1 Herstellung

Speisefette werden heute fast ausschließlich großindustriell hergestellt, da nur die professionellen Fetthersteller die Möglichkeit besitzen, Fettkompositionen den Wünschen der Kunden entsprechend herzustellen. Es gelten strenge Qualitätskriterien.

Die Einstufung des Cholesterins als Risikofaktor für die menschliche Ernährung hat in den letzten 40 Jahren zu einer starken Zunahme der Nachfrage nach pflanzlichen Fetten geführt. Deshalb sind tierische Fette (Ausnahme: Butter) in Deutschland nur noch von relativ geringer Bedeutung für die menschliche Ernährung. Die auf dem Markt erhältlichen Speiseöle unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Herstellungsweise. Im Wesentlichen wird dabei zwischen raffinierten und kaltgepressten Ölen unterschieden (KRIST, 2013). Kaltgepresste Speiseöle werden nur aus erlesenen und sorgfältig verarbeiteten Samen und Früchten hergestellt. Kaltpressung bedeutet, dass die Öle ohne Wärmezufuhr ausschließlich durch mechanische oder andere physikalische Verfahren gewonnen werden. Diese Öle sind dem Naturprodukt sehr ähnlich, denn kaltgepresste Öle haben noch den natürlichen Gehalt an freien Fettsäuren und der Vitamingehalt ist ebenfalls unverändert (RIMBACH et al., 2010).

Die meisten Ölsaaten werden importiert. Aus ihnen wird das Fett mit Schneckenpressen und anschließender Extraktion im Gegenstromverfahren mit Hexan oder Ethylmethylketon gewonnen. Weniger wertvolle Öle werden durch alleiniges Extrahieren aus den zerkleinerten Früchten gewonnen. Werden Öle durch Kaltpressung gewonnen, beträgt die Ausbeute in der Regel lediglich 20–50 %. Dieses Öl enthält zwar noch alle Vitamine und

2. SCHRIFTTUM

Lecithin, aber auch noch alle Verunreinigungen (z. B. Pestizide) (KRIST 2013; RIMBACH et al., 2010).

Der bedeutendste Herstellungsweg für die „Massenöle“ ist die Extraktion mit Leichtbenzinen (Hexan). Dies führt zu einer Ölausbeute von 99 % (RIMBACH et al., 2010). Da aber auch durch eine anschließende Erhitzung die Lösungsmittelreste nicht gänzlich eliminiert werden können, ist zumeist eine anschließende **Raffination** erforderlich. Diese setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen:

- Zur **Entschleimung** werden wässrige Salz- oder Säurelösungen (z. B. Phosphorsäure) zugesetzt und im Separator zentrifugiert. Bei phosphatidreichen Ölen (Soja, Raps) wird zur Abscheidung des Lecithins eine Entlecithinierung vorgeschaltet. Die Aufgabe des Lecithins im Samen ist die Stabilisierung des als Energiereserve gespeicherten Öls. Es findet gereinigt u. a. in der Margarineproduktion Verwendung. Bei der Entschleimung werden vorwiegend Glykoproteine entfernt, welche sich als Trübstoffe ansonsten als Bodensatz absetzen würden (KALTSCHMITT et al., 2009).
- Die **Entsäuerung** dient der Entfernung freier, ungebundener Fettsäuren, welche eine Geschmacksbeeinträchtigung des Öls mit sich führen würden. Eine Reihe von physikalischen und chemischen Methoden steht hierfür zur Auswahl. Die am häufigsten verwendete Methode ist die Neutralisation mit Alkalilaugen unter Bildung von Seifen und Wasser.
- Zur **Entfärbung** (Bleichung) werden die Fette mit Bleicherden (z. B. Kieselerde oder Aktivkohle) behandelt und diese anschließend durch Zentrifugieren abgeschieden. Durch Van-der-Waals-Kräfte werden Farbstoffe (Carotinoide, Chlorophylle) durch die Bleicherden gebunden.
- Anschließend erfolgt die **Dämpfung** bzw. **Desodorierung**. Prinzipiell werden dabei Lösungsmittelreste und unerwünschte Geruchs- und Geschmackskomponenten entfernt, um somit ein geschmacklich und geruchlich einwandfreies Öl zu erhalten. Auch der Gehalt an freien Fettsäuren wird auf ein Minimum reduziert und Peroxide werden zerstört, um dadurch die Oxidationsstabilität zu verbessern. Die Öle werden dabei für 3-6 Stunden mittels überhitzten Wasserdampfs (unter Vakuum) auf 180-270 °C erwärmt und anschließend wieder abgekühlt. Bei diesem Schritt können die in ungesättigten Fettsäuren vorliegenden isolierten Doppelbindungen zu konjugierten Systemen isomerisieren, deren

Nachweis (mittels HPLC) zur Erkennung eines raffinierten Fettes angewendet werden kann (KALTSCHMITT et al., 2009; KOERBER et al., 2004).

- Trübungen des Speiseöls nach Auslieferung in den Einzelhandel werden vermieden, indem die **Winterisierung** als weiterer Schritt der Raffination durchgeführt wird. Dies ist ein physikalisches Verfahren, welches zur künstlichen Modifikation von Produkteigenschaften eingesetzt wird (KALTSCHMITT et al., 2009). Dabei werden kälteunbeständige Fette industriell abgekühlt und anschließend blank gefiltert. Dieser Prozess verhindert das Abscheiden fester Bestandteile bei längerer Aufbewahrung unter 4 °C (früher im Winter auftretend) und stellt lediglich ein „kosmetisches“ Verfahren dar, damit Öle auch bei Kühlschranktemperaturen noch ein klares Erscheinungsbild haben (RIMBACH et al., 2010).

Die jährliche weltweite Ölproduktion betrug 2012 etwa 158 Millionen Tonnen (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, 2012). Das am meisten produzierte Öl war Palmöl mit etwa 50 Millionen Tonnen, gefolgt von Sojaöl mit 41,5 Millionen Tonnen und Rapsöl mit 23,5 Millionen Tonnen. Die jährliche Ölproduktion in Deutschland betrug fast 8,8 Millionen Tonnen (Stand 2012), davon 3,2 Millionen Tonnen Rapsöl. Mit knapp 600000 Tonnen steht Sojaöl in Deutschland an zweiter Stelle der Produktionsmenge. Auf Sonnenblumen- und Tafelöl entfällt der größte Anteil des konsumierten Speiseöls. Bei Tafelöl handelt es sich meist um Rapsöl. Olivenöl und Maiskeimöl machen einen weitaus kleineren Anteil aus (RIMBACH et al., 2010).

2.8.1.2 Vorkommen von ZEA in Speiseölen

Da die meisten Mykotoxine (auch ZEA) einen positiven Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten besitzen, d. h. sich bevorzugt in der unpolaren Phase befinden, ist es nicht auszuschließen, dass diese bei der Ölgewinnung in die Fettphase übergehen und somit auch im Endprodukt nachweisbar sind (KOCHER, 2006). Durch sich anschließende Raffinationsschritte können Mykotoxine teilweise abgebaut werden.

In der neueren wissenschaftlichen Literatur wurde bereits über das Vorkommen von ZEA in Speiseölen berichtet. LAUREN und RINGROSE (1997) zeigten bereits, dass bei unterschiedlichen Fusarientoxinen während der Nassvermahlung von beispielsweise Mais

eine Anreicherung von ZEA in der Fraktion der Keimlinge entsteht. So konnte auch in einem daraus hergestellten Maiskeimöl das Vorkommen von ZEA belegt werden.

Für den Nachweis von ZEA in Speiseölen wurden mittlerweile einige Methoden entwickelt: KAPPENSTEIN et al. (2005b) entwickelten ein Verfahren zur Bestimmung von ZEA mittels Gelpermeationschromatographie (GPC), auch SEC (Size Exclusion Chromatography, Größenausschlusschromatographie) genannt (siehe Kapitel 2.7.3.2). Dieses Verfahren gilt mittlerweile als „traditionelle Probenaufbereitungsmethode“ für ZEA in Ölen, nachdem es zuvor in der Mykotoxinanalytik nur für die Aufreinigung von Aflatoxinen bekannt war. KAPPENSTEIN et al. (2005b) lösen dabei die Probe in GPC-Elutionsmittel (Cyclohexan/Ethylacetat) und fügen einen internen Standard hinzu. Das so gelöste Öl wird in ein Probenvial für die GPC überführt. Der GPC-Rückstand wird benutzt, um ihn anschließend mittels LC-MS/MS zu untersuchen. Auch die HPLC-FLD-Analytik kann genutzt werden, wobei ein weiterer Aufreinigungsschritt (mittels IAC) nötig wird.

KOCHER (2006) entwickelte in Anlehnung an KAPPENSTEIN et al. (2005b) eine routinetaugliche Multimethode zur Bestimmung von verschiedenen Mykotoxinen in Öl, welche ohne großen apparativen und personellen Aufwand durchgeführt werden kann. Dabei wird das Öl mit Hexan versetzt und ein Methanol-Wasser-Gemisch bzw. ein alkalisches Methanol-Wasser-Gemisch (für Mykotoxine, welche sich besser im Alkalischen lösen, wie ZEA, Fumonisine oder Ochratoxin A) zugegeben. Nach der Phasentrennung und eventueller Aufkonzentrierung können die Gemische direkt zur Messung mittels LC-MS/MS eingesetzt werden.

Auch GOTTSCHALK et al. (2009) nutzen die Probenaufbereitung mittels GPC und anschließender Messung mittels LC-MS/MS zur Detektion von ZEA und weiteren Mykotoxinen. Da jedoch nicht sehr viele Laboratorien in Deutschland GPC verwenden, sind die Versuche gescheitert eine offizielle Methode (§ 64 LFGB) zur Bestimmung von ZEA in Speiseölen nach der KAPPENSTEIN-Methode zu etablieren (USLEBER, persönliche Mitteilung).

MAJERUS et al. (2009) hatten deswegen das Bestreben, eine schnelle, kostengünstige und sensitive Methode als Alternative zur GPC zu entwickeln. Bei dieser „Acid-Base-Treatment-Methode“ werden Ölproben mit einem alkalischen Methanol-Wasser-Gemisch (Methanol + 10 g/l Ammoniumcarbamatlösung) extrahiert. Anschließend wird der pH mittels Salzsäure neutralisiert und der Extrakt abgedampft. Der Rückstand wird in HPLC-

Fließmittel gelöst und der ZEA-Gehalt mittels HPLC-FLD bestimmt. Die Methode wurde erfolgreich für Maiskeimöl und Rapsöl validiert. Das Prinzip dieser Methode besteht aus der Öffnung des Laktonringes von ZEA durch die relativ lange alkalische Extraktion, wodurch die fluoreszenten Eigenschaften von ZEA verloren gehen. Durch die Neutralisation mit Salzsäure schließt sich der Ring wieder und ZEA kann mittels HPLC-FLD erfasst werden. Diese neue Methode ist mittlerweile die Grundlage für das offizielle HPLC-FLD-Verfahren zur Bestimmung von ZEA in pflanzlichen Ölen der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

Als Alternative zur GPC und zur Flüssig-Flüssig-Verteilung haben SIEGEL et al. (2010) eine Methode mit hydrazinfunktionalisiertem Polymerharz zur Bestimmung von ZEA in Ölen entwickelt. Diese neuartige, kostengünstige Methode mittels DCHC (dynamic covalent hydrazine chemistry) wurde zur Anwendung mit HPLC-FLD entwickelt und validiert. Dabei wird die Ölprobe mit Methanol und Polymerharz versetzt. Nach einigen Extraktionsschritten wird das Harz mittels Stickstoff verdampft und der Rückstand in HPLC-Fließmittel gelöst. Das Prinzip dieser DCHC-Methode besteht aus der Bildung von kovalenten Bindungen zwischen dem Analyten und der flüssigen Phase. Bei ZEA eignet sich die unkonjugierte Carbonylgruppe (siehe Abbildung 1) zur Ausbildung von reversiblen Hydraxon-Formationen durch Hydrazinfunktionalisierte Festphasen.

Die bisherigen Erkenntnisse über den ZEA-Gehalt von Speiseölen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Auch in einer Laborvergleichsstudie Anfang des Jahres 2011 wurden Ergebnisse über den Gehalt an ZEA von Speiseölen veröffentlicht (siehe Kapitel 4.4). Durchgeführt wurde diese Studie von der BAM (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung). Teilgenommen haben zehn verschiedene deutsche Laboratorien. Da jedem Laboratorium die Auswahl des Analysenverfahrens freigestellt war, sollte die Laborvergleichsstudie auch zu einem Vergleich aktuell verwendeter Verfahren beitragen, ohne den Anspruch auf eine Methodenvergleichsstudie zu erheben. Es wurden insgesamt drei verschiedene Maiskeimöle für die Untersuchung im Ringversuch ausgewählt. Bei diesen Proben handelte es sich um natürlich kontaminierte Proben, eine der Proben wurde zusätzlich künstlich mit ZEA dotiert. Zusätzlich zu den Ölproben wurde eine Lösung von ZEA in Acetonitril mit definierter Konzentration (den Teilnehmern unbekannt) zur Untersuchung freigegeben. Nachdem alle Laboratorien ihre Ergebnisse eingeschickt hatten, wurden die

2. SCHRIFTTUM

Resultate der Laborvergleichsstudie im März 2011 veröffentlicht (siehe auch Kapitel 3.2.3 und Kapitel 4.4).

Tabelle 10: Zusammenfassung bisheriger Untersuchungen von Speiseölen auf ZEA

Methode	Proben (n)	(n) positiv	mittlerer Gehalt	WFR (%)	NWG (Quantifizierungsgrenze)	Referenz
HPLC	Maiskeimöl (3)	1	4,6 mg/kg	86,9	-	LAUREN und RINGROSE (1997)
GPC, LC-MS/MS, HPLC-FLD	Maiskeimöl (38)	38	169,7 µg/kg	LC-MS/MS: 85-98 HPLC-FLD: 79-88	LC-MS/MS: 0,3 µg/kg HPLC-FLD: 3 µg/kg	KAPPENSTEIN et al. (2005b)
	Sojaöl (20)	14	4,2 µg/kg			
	Weizenkeimöl (11)	10	12,7 µg/kg			
	andere Öle (8)	0	-			
HPLC-FLD	Maiskeimöl Rapsöl	-	-	87	10 µg/kg (20 µg/kg)	MAJERUS et al. (2009)
HPLC-FLD	Maiskeimöl (6)	4	99 µg/kg	89	10 µg/kg (30 µg/kg)	SIEGEL et al. (2010)
	Oliveöl (5)	-				
	Erdnussöl (2)	-				
	Rapsöl (8)	-				
	Sesamöl (3)	-				
	Sonnenblumenöl (6)	-				
	Weizenkeimöl (3)	-				
	Traubenkernöl (4)	-				
	Leinöl (1)	-				
	Kürbiskernöl (1)	-				
	Reisöl (1)	-				
	Salatöl (1)	-				
	Sojaöl (1)	-				
	Distelöl (1)	-				
	Walnussöl (1)	-				

NWG: Nachweisgrenze; WFR: Wiederfindungsrate

2.8.2 Sahne

Sahne wird auch als Rahm bezeichnet und ist der fetthaltige Teil der Milch, welcher durch Zentrifugation in Separatoren von der Magermilch getrennt wird oder sich durch einfaches Stehenlassen von ungesäuerter Rohmilch natürlich absetzt. Sahne ist technisch gesehen eine Emulsion von MilCHFett in Wasser; die daraus (durch Emulsionsumkehr) hergestellte Butter eine Emulsion von Wasser in MilCHFett (KRÖMKER, 2007).

Sahne und Sahneerzeugnisse enthalten mindestens 10 % Fett. Der gewünschte Fettgehalt wird durch Mischen von Rahm und Magermilch erreicht. Auch eine zusätzliche Anreicherung mit Milcheiweißerzeugnissen kann erfolgen. Sahne enthält im Vergleich zu Milch weniger Milcheiweiß, mehr Fett und mehr fettlösliche Vitamine. Sie ist Ausgangsstoff für die Butter- und Käseherstellung, wird aber auch frisch in der Küche verwendet. Durch die verschiedenen Möglichkeiten der Haltbarmachung sind die Sahneprodukte von wenigen Tagen bis zu einem Jahr haltbar. Im Handel befindliche frische Sahne ist immer pasteurisiert. Sie hält gekühlt vier bis sechs Tage. Andere Wärmebehandlungen müssen als solche auf der Verpackung gekennzeichnet sein: ultrahocherhitzte Sahne hält ungekühlt bis zu sechs Wochen, sterilisierte bis zu einem Jahr. Unterschieden werden die Sahneerzeugnisse anhand ihres Fettgehaltes und ihrer Konsistenz (RIMBACH et al., 2010):

- **Kaffeesahne** enthält mindestens 10 % Fett (oft auch mehr) und wird durch Ultrahocherhitzung, Sterilisieren oder Kondensieren haltbar gemacht. Sie ist ein Süßrahmprodukt und lässt sich nicht aufschlagen. Mittels Homogenisierung kann die Weißkraft von Kaffeesahne erhöht werden (KRÖMKER, 2007).
- **Schlagsahne** enthält mindestens 30 % Fett. Unter der Bezeichnung „Schlagsahne extra“ versteht man eine Schlagsahne mit 36 % Fett, welche besonders gut schlagbar ist. Durch das Aufschlagen wird das Volumen enorm vergrößert, weil sich ein immer feineres dreidimensionales Netz bildet, in dem die Luft gefangen ist, da sich die Fettkügelchen an die Luftbläschen binden (KRÖMKER, 2007). Gut gekühlt ist Sahne besonders schlagfähig. Wird sie zu lange oder zu heftig geschlagen, bildet sich Butter. Es gibt sprühfertige Schlagsahne in Dosen zu kaufen, welche mit Treibgas arbeiten. Diese sind oft schon gesüßt.

- **Crème double** ist ein Süßrahmprodukt mit mindestens 40 % Fett und stichfester Konsistenz (KRÖMKER, 2007).

2.8.2.1 Herstellung

Sahne entsteht durch Aufrahmen der Milch. Dabei steigen die in der Milch enthaltenen Fettkügelchen an die Oberfläche und setzen sich dort als Rahm ab. Diese natürliche Aufrahmung ist nur ohne Homogenisierung möglich, da dadurch die Fettkügelchen zu stark zerkleinert werden. Industriell wird Sahne aber durch Zentrifugation gewonnen. Das MilCHFett wird soweit abgetrennt, dass die verbleibende Magermilch nur noch einen Fettgehalt von 0,03-0,06 % aufweist (KRÖMKER, 2007; RIMBACH et al., 2010).

2.8.2.2 Vorkommen von ZEA in Sahne und Sahneerzeugnissen

Bisher gibt es keine Veröffentlichungen über das Vorkommen von ZEA oder anderen Mykotoxinen in Sahne. Da ZEA jedoch in die Milch übergehen kann (siehe Kapitel 2.6) und zudem lipophil ist (vergleiche Kapitel 2.8.1.2), stellt sich hier die Frage, ob sich ZEA nach einem möglichen carry-over in die Milch, eventuell aufkonzentriert in der Fettfraktion (Sahne) vorfindet.

2.8.3 Kakaohaltige Milchmischgetränke und Schokoladendesserts

2.8.3.1 Allgemeines über Kakao

Als Kakao bezeichnet man die Samen des Kakaobaumes (Kakaobohnen) sowie das daraus hergestellte Pulver. Kakaopulver und Kakao sind „Erzeugnisse aus zu Pulver verarbeiteten, gereinigten, geschälten und gerösteten Kakaobohnen, das mindestens 20 Prozent Kakaobutter, auf das Gewicht der Trockenmasse bezogen, und höchstens 9 Prozent Wasser enthält“ (KAKAOVERORDNUNG, 2003).

Der Kakaobaum (*Theobroma cacao*) gehört zur Gattung *Theobroma* in der Familie der *Malvaceae* (Malvengewächse). Eine weitere wichtige Nutzpflanze dieser Familie ist die Baumwolle. Der botanische Name des Kakaobaums stammt von dem schwedischen

2. SCHRIFTTUM

Naturwissenschaftler Carl von Linné, der ihm den Namen *Theobroma cacao* gab (aus dem Griechischen *theos*: „Gott“ und *broma*: „Speise“) (COE und COE, 1999). Der Kakaobaum war ursprünglich im Bereich des Amazonas beheimatet. Der erste Kakaoanbau wurde vermutlich um 1.500 v. Chr. von den Olmeken in Mittelamerika betrieben (RIMBACH et al., 2010). Bereits die Azteken und die Mayas bauten Kakao an und er diente ihnen als Kraft- bzw. Heiltrunk (RIMBACH et al., 2010). Im Aztekenkult war der Kakaobaum Sinnbild für Kraft und Herrschaft und Gottheiten wurden meist zusammen mit einem Kakaobaum dargestellt (COE und COE, 1999). Durch die Entdecker der neuen Welt wurde das Kakaogetränk nach Europa gebracht. Die Europäer versetzen es im Gegensatz zur ursprünglichen Zubereitung mit Rohrzucker (SCHOELLER, 1969). Eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung der Schokolade in Deutschland spielte der Holländer Cornelius Bontekoe (1647-1688), der der Leibarzt des Kurfürsten Friedrich Wilhelm (1620-1688) war. Er empfahl Schokolade als Stärkungsmittel und kategorisierte sie als Wunderarznei. Auch Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832) war als berühmte deutsche Persönlichkeit ein großer Schokoladenliebhaber (SCHAARSCHMIDT, 2008). Die feste Schokolade in Form von Tafeln gab es aber erst ab Ende des 18. Jahrhunderts. Zu dieser Zeit entstanden auch die großen europäischen Schokoladenfabriken (SCHAARSCHMIDT, 2008).

Der Kakaobaum kann zwar bis zu 15 Meter hoch werden, wird auf Plantagen aber meistens auf vier Meter gekürzt. Die gelben Früchte des Kakaobaums sind etwa 15-20 Zentimeter lang und wiegen bis zu 500 Gramm. Die 30–60 weißlichen Samen, die von einem weißen, süßen, schleimigen und sehr schmackhaften Fruchtfleisch (Pulpa) umgeben sind, befinden sich unter der Schale in fünf Reihen angeordnet (HOMBORG, 2012; SCHAARSCHMIDT, 2008). Aus den Samen, den Kakaobohnen, wird nach einem komplizierten Umwandlungsprozess Kakaomasse, Kakaopulver und Kakaobutter hergestellt (siehe unten). Zwei Varianten des Kakaobaums werden unterschieden: Criollo („Einheimischer“, helle, empfindliche Edelsorte, große Nuss mit dünner Schale, vor allem in Mittel- und Südamerika wachsend) und Forastero („Fremdling“, dunklere, herbe Sorte, gegen Umwelteinflüsse resistenter, vor allem in Afrika vorkommend). Fast alle Kakaopflanzen der Welt sind aus diesen beiden gekreuzt, teils jedoch mit nationalen Wildpflanzen gemischt (SALTINI et al., 2013; SCHAARSCHMIDT, 2008). Der Kakaobaum wächst nur bei feucht-heißem Klima und nicht über 500 Meter Höhe. Meist wird der Kakaobaum unter Schattenbäume, sogenannte Kakaomütter, gepflanzt. Verwendet werden hierzu z. B. Bananen-Stauden, Kokospalmen, Affenbrotbäume,

2. SCHRIFTTUM

Umbrella- oder Zitrusbäume (RIMBACH et al., 2010; SCHAARSCHMIDT, 2008). Dadurch werden die Pflanzen vor zu praller Sonne geschützt und die Luftfeuchtigkeit wird erhöht. Durch die Wurzeln wird auch die Auswaschung des Bodens verhindert. Der Baum trägt vom 4. bis etwa zum 50. Lebensjahr Früchte (COE und COE, 1999). Bestäubt werden die Blüten nicht wie bei Kaffee und anderen Nutzpflanzen von Bienen, sondern von Mücken. Unter günstigen Voraussetzungen blüht der Baum ganzjährig und wird zweimal im Jahr (Frühjahr und Sommer) geerntet (RIMBACH et al., 2010).

Die Hauptanbaugebiete von Kakao haben sich inzwischen von Mittelamerika nach Afrika verlagert (MOODIE-KUBLALSINGH, 1994). Das Land mit der größten Kakaoproduktion der Welt ist die westafrikanische Elfenbeinküste, die über 30 % der weltweiten Ernte des Jahres 2012 produzierte. Die Gesamtproduktion betrug in jenem Jahr 5 Millionen Tonnen (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAOSTAT, 2012). Zu den zehn größten Anbaugebieten gehören außerdem Indonesien, Ghana, Nigeria, Kamerun, Brasilien, Ecuador, Togo, Papua-Neuguinea sowie die Dominikanische Republik.

Eine Beschreibung der Gewinnung von Kakaobohnen sei hier wie von RIMBACH et al. (2010) publiziert wiedergegeben:

Die am Stamm wachsenden Früchte werden abgeschlagen und anschließend aufgeschlagen, um die Fermentierung (Rotten) zu starten. Diese dauert zehn Tage. Dabei bilden sie ihre typischen Geschmacks- und Aromastoffe und ihre Farbe. Das weiße, zuckerhaltige Fruchtfleisch, die Fruchtpulpe, beginnt sehr schnell zu gären und entwickelt Temperaturen von etwa 50 °C. Die beginnende Keimung der Samen wird durch den in der Gärung entstehenden Alkohol gestoppt. Die anschließende Trocknung erfolgt in der Sonne (vorzugsweise) oder in Trockenöfen. Dies ist notwendig, um eine optimale Lagerungsfähigkeit bei einer Restfeuchte von 6 % zu erhalten. Die Bohnen sind getrocknet etwa nur noch 50 % so groß und werden so meist in Industrieländer verschifft. Bei der dortigen Weiterverarbeitung werden sie gewaschen und anschließend bei mehr als 120 °C geröstet. Die Ziele der Röstung sind die Inaktivierung von Enzymen (fettspaltende Esterase), die Reduktion des Wassergehaltes auf unter 3 %, die Entfernung leichtflüchtiger Aromastoffe (z. B. Essigsäure, Essigsäureester), die Abtötung von Schädlingen und die Härtung des Kakaobohnenkerns zur leichteren Ablösung der Samenschale.

Bei der Herstellung von Kakaopulver wird die gemahlene Kakaobohnenmasse mittels hydraulischen Pressen (bei 80-90 °C) vom Kakao-Fett, der sogenannten Kakaobutter, getrennt. Als Hilfsmittel dienen hierzu Alkalisalze (z. B. Pottasche oder Natriumcarbonat), wodurch sich das Fett besser von der restlichen Masse trennen lässt. Dieses fließt als goldgelbe, klare Kakaobutter ab. So wird der Fettgehalt, je nach Pressdauer, von 52 % auf 10-22 % reduziert. Übrig bleibt der Kakaopresskuchen. Das Alkalisieren beeinflusst sowohl die Farbe (dunkler) als auch den Geschmack (milder) des Kakaopulvers. Die abgetrennte Kakaobutter wird hauptsächlich zur Herstellung von Schokolade verwendet, ist aber auch in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten zu finden (HOMBORG, 2012).

Die bei der Kakaoherstellung anfallenden Schalen können für Tees, zur Gewinnung von Theobromin und Koffein, als Zusatz zu Futtermitteln sowie als Düngemittel oder Heizmaterial verwendet werden (LIST und HÖRHAMMER, 1979). Aufgrund ihres hohen Energie- und Protein-Gehaltes werden die Reste aus der Kakaoverarbeitung oft an Tiere verfüttert, speziell an Pferde, Hunde, Schweine, Rinder und Hühner. Missbräuchlich werden diese auch als Dopingmittel für Hunde und Pferde benutzt (hoher Theobromingehalt der Kakaobohnen). Beachtet werden hierbei muss, dass Theobromin von diesen Tieren nicht verstoffwechselt werden kann und somit toxisch wirkt (LD₅₀ beim Hund: 300 mg/kg Körpergewicht) (SCHAARSCHMIDT, 2008).

Kakaopulver, welches zur Herstellung von Getränkpulver dienen soll, muss zusätzlich in seinen Löslichkeitseigenschaften verbessert werden. Dazu wird der Kakaokuchen in einer Dampfphase oder einem wässrigen Aerosolnebel oberflächlich benetzt und dadurch verklebt. Anschließend wird der Kakaopresskuchen zu Kakaopulver vermahlen, welches das Ausgangsprodukt für viele Lebensmittel darstellt (Soßen, Gebäck, Eis, Schokoladenmousse, Schokoladenpudding, Schokoladengetränke usw.) (HOMBORG, 2012).

2.8.3.2 Herstellung und Kakaogehalte von kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen und Schokoladendesserts

Kakaohaltige Milchmischerzeugnisse sind kommerziell in verschiedenen Varianten erhältlich. Sowohl fettarme Milch als auch Vollmilch werden zur Herstellung verwendet. Auch laktosefreie und zuckerreduzierte Kakaogetränke sind auf dem Markt. Unterschieden

werden kann auch anhand der Verwendung von frischer Milch oder ultrahocherhitzter Milch, wobei auch teilweise Molkenerzeugnisse zugesetzt werden. Meistens wird Kakaopulver (zum Teil fettreduziert oder stark entölt) als Zusatz verwendet. Dessen Gehalte schwanken zwischen 1,0 % und 1,9 %. Bei einer großen Anzahl an kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen wird die Inhaltsangabe „Schokoladenpulver“ angegeben (meist 4 % der Gesamtmenge des Produkts, bestehend aus Zucker und Kakaopulver). Auch die Mischung dieser Zutatenangaben ist zu finden (z. B. 1,9 % Schokoladenpulver, 0,6 % fettarmer Kakao). Ebenso sind speziellere Getränke mit beispielsweise 14 % Schweizer Schokolade oder 2,2 % fettarmem Kakaopulver aus Arriba Edelkakao im Einzelhandel zu finden.

In Deutschland sind verschiedenste Schokoladendesserts kommerziell erhältlich. Die gängigsten sind Schokoladenpudding, Mousse au chocolat, Quark-Joghurt-Cremes mit Schokoladenraspeln, Schokoladen-Grießdesserts oder Joghurt mit Schokolade bzw. Stracciatella-Zubereitung. Für industriell hergestellten Schokoladenpudding ist pasteurisierte und homogenisierte Milch die Grundlage. Diese wird anschließend mit Mehl und Zucker vermischt und erhitzt. Kakaopulver (oft fettarm) wird nun ebenso hinzugefügt. Oftmals sind keine prozentualen Angaben des Kakaogehaltes auf den Verpackungen der im Einzelhandel erhältlichen Desserts zu finden. Falls angegeben, schwankt der Gehalt an Kakaopulver jedoch zwischen 0,8 % und 3,1 %. Häufig wird laut Herstellerangaben zur Zubereitung von Schokoladenpudding zusätzlich 5-6 % Schokolade (selten auch 0,5 %) verwendet. Anderer Schokoladenpudding enthält nur Schokolade, ohne zusätzliches Kakaopulver, z. B. 2,6-2,9 % (bestehend aus Zucker, Kakaopulver und Kakaobutter). Nach der Abkühlung wird der Pudding verkaufsfertig verpackt. Bei der Herstellung der aus Frankreich stammenden Mousse au chocolat wird Bitterschokolade oder Blockschokolade vorsichtig geschmolzen, Eigelb mit Zucker schaumig geschlagen, Sahne und die geschmolzene Schokolade nach und nach untergerührt und schließlich Eischnee untergehoben (DEUERLING, 2010). Enthalten sind bei industriell hergestellten Produkten laut Inhaltsangabe 6 % Schokolade und 2,7 % fettarmes Kakaopulver. Viele weitere Variationen an Schokoladendesserts sind im Handel erhältlich. So wird beispielsweise Schokoladensoße zu Grießdesserts oder Milchreis zugefügt. Die Angabe des Kakaogehalts schwankt dabei sehr: 1,2 % fettarmes Kakaopulver als niedrigster Gehalt, 2,3 % Kakao- und Schokoladenerzeugnisse oder 25 % Schokoladenzubereitung mit 3 % Schokolade. Quark-Cremes oder Joghurt werden oft mit Schokoladensplittern versetzt (Stracciatella).

Enthalten sind in diesen Produkten 12-20 % Stracciatellazubereitung mit meist 2,5 % Schokoladenraspeln (selten 2,0 % bzw. 3,6 %). Auch Schokoladenjoghurt mit 8 % Schokolade (Kakaomasse, Kakaobutter, Zucker) oder 10 % dunkle Schokolade (Kakaomasse, Zucker, fettarmes Kakaopulver, Kakaobutter) ist erhältlich.

2.8.3.3. Mykotoxine in Kakao

Aufgrund klimatischer und hygienischer Bedingungen bei Anbau, Ernte und Transport sowie aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung gelten Kakao und Kakaoprodukte zu den in Bezug auf eine Mykotoxinkontamination gefährdeten Rohstoffen. Im Gegensatz zu Getreide und anderen bekannten Rohstoffen wurde Kakao jedoch in der Vergangenheit kaum systematisch auf Mykotoxine untersucht.

Über ZEA in Kakao ist in der wissenschaftlichen Literatur lediglich eine Veröffentlichung zu finden. SCHOLTEN et al. (2010) entwickelten eine Multimethode zur Bestimmung von Pestiziden und Mykotoxinen in Kakaobohnen, unter anderem auch zur Detektion von ZEA. Sie wiesen dabei in elf von 108 Kakaobohnenproben ZEA im Bereich von 28-390 µg/kg Probe nach (siehe Tabelle 11). Verwendet wurde hierzu eine Extraktionsmethode basierend auf Acetonitril. Gemessen wurden die Mykotoxinkontaminationen mittels einer UPLC-MS/MS-Methode.

Mit ein Grund für die geringe Forschungstätigkeit in Hinblick auf eine Mykotoxinbelastung von Kakao und Kakaoprodukten ist wohl auch in der Tatsache begründet, dass Kakao (wie auch Kaffee) nicht als anfällig für eine Mykotoxinbelastung galt. Im Allgemeinen wurde angenommen, dass die Mykotoxinproduktion durch das enthaltene Koffein inhibiert wird (HURST und MARTIN, 1983; HURST et al., 1987). Das Interesse an mykotoxikologischen Aspekten bei Kakao und Kakaoprodukten wuchs, als Ende der 90er Jahre erstmals Ochratoxin A (OTA) in Kakao nachgewiesen werden konnte (KOCH et al., 1996; STRAUSS, 1997). Der Fokus ist weiterhin auf OTA gelegt worden, zudem wurde Kakao öfters auf Aflatoxine (AF) untersucht (AMÉZQUETA et al., 2004; AMÉZQUETA et al., 2005; BONVEHI, 2004; RATERS, 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008; TAFURI et al., 2004). Nachfolgend sind einige publizierte Daten zur Mykotoxinkontamination von Kakao und Kakaoprodukten zusammengefasst (Tabelle 11).

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 11: Zusammenstellung von Daten zur Belastung von Kakao und Kakaoprodukten mit Mykotoxinen

Probenart	n	Mykotoxin	pos (%)	Kontaminationshöhe (µg/kg)	Referenz
Kakaobohnen	46	OTA	63	0,041-3,35	AMÉZ-QUETA et al. (2004)
Versch. Kakaoprodukte	170	OTA	85	0,1-23,1	BONVEHÍ (2004)
Kakaopulver	18	OTA	50	0,22-0,77	TAFURI et al. (2004)
Kakaobohnen	22	OTA	100	0,35-3,88	AMÉZ-QUETA et al. (2005)
Kakao, Kakaoprodukte, Schokoladen-erzeugnisse	645 (OTA und AF) 256 (DON)	OTA AF DON	67 71 5	15,9 (max) (Median: 0,2) 31,5 (max) (Median: 0,11) 110 (max) (Median: < NWG)	RATERS (2008)
Kakaobohnen	107	OTA AF ZEA	32 28 10	0,53-13 0,54-8,5 28-390	SCHOLTEN et al. (2010)
Kakaobohnen	54	OTA	70	0,1-3,5	DE MAGAL-HAES et al. (2011)
Schokolade	125	OTA AF	98 80	0,31-0,39 (Maximalwerte) 0,43-0,66 (Maximalwerte)	COPETTI et al. (2012)

Aus den Daten in Tabelle 11 ergibt sich, dass die national geltende Höchstmengenregelung von 4 µg/kg AF für Lebensmittel allgemein (Kontaminanten-Verordnung, KmV) teilweise überschritten wird. Für OTA, DON und ZEA in Kakao und Kakaoprodukten sind derzeit weder national noch auf EU-Ebene Höchstmengenregelungen verfügbar. Für OTA in Kakao und Kakaoerzeugnissen wurden jedoch Höchstmengen in einem Arbeitsdokument des Sachverständigenausschusses für landwirtschaftliche Schadstoffe des europäischen wissenschaftlichen Lebensmittelkomitees der Europäischen Gemeinschaft vorgeschlagen. Diese reichen von 1 µg/kg für verarbeitete Kakaoerzeugnisse bis zu 2 µg/kg für Rohprodukte. Aus den Daten in Tabelle 11 ist ersichtlich, dass einige untersuchte Proben diese vorgeschlagenen Höchstmengen überschreiten würden.

Zusätzlich zur Überprüfung des Vorkommens der genannten Mykotoxine und der Erarbeitung geeigneter Analysenmethoden hat RATERS (2008) Studien zu deren Verteilung in den Produkten betrieben. Die Verteilungscharakteristik ergab eine nicht homogene Verteilung, jedoch kein Auftreten echter *hot spots*. Weiterhin ergab sich, dass vielmehr die Stufen des Nacherntebereiches (vor allem Fermentation und Trocknung) als die Verarbeitungsschritte bis zur Ernte für die Infektion und das Wachstum toxinogener Schimmelpilze und für die Bildung von Mykotoxinen verantwortlich sind. Im Rahmen ihrer Arbeit erwiesen sich frische Kakaofrüchte als mykotoxinfrei. Künstliche Trocknung ist im Vergleich zu Sonnentrocknung vorzuziehen, da die Kontaminationsrisiken geringer sind. Ebenso konnte anhand eines Modellversuches nachgewiesen werden, dass Lager- bzw. Transporttemperaturen unter 20 °C geeignet sind, um Schimmelwachstum bzw. Mykotoxinbildung zu verhindern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der AF- bzw. OTA-Gehalte auf den Kakaoschalen lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde erkannt, dass durch die Kakaoröstung die Mykotoxinmenge reduziert werden kann. Allerdings kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass das Reduzierungspotenzial von AF und OTA im Rahmen der industriellen Kakaoröstung weitestgehend ausgeschöpft ist. Ob diese Erkenntnisse über AF, DON und OTA auch auf ZEA übertragbar sind, ist bisher noch nicht erforscht.

Andere wissenschaftliche Arbeiten beschäftigen sich mit der mykologischen Belastungssituation von Kakao und Kakaoprodukten. SÁNCHEZ-HERVÁS et al. (2008) finden auf Kakaobohnen die Pilze *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus carbonarius*, wovon viele fähig sind, OTA und AF zu bilden. OYETUNJI (2006) untersuchte die mykologische Belastung von nigerianischen Kakaogetränken und kam zu der Erkenntnis, dass *Aspergillus* und *Mucor* die am häufigsten vorkommenden Pilzarten sind. Es finden sich auch *Rhizopus*, *Penicillium* und *Mycelia sterilia* in den Getränken. In einigen weiteren Studien werden außerdem *Aspergillus amstelodani*, *A. repens*, *A. ruber*, *A. melleus*, *A. chraceous*, *A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. tubingensis*, *A. llavus*, *Paecilomyces*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Mucor pusillus*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus oryzae* und *Absidia corymbifera* gefunden (ARDHANA und FLEET, 2003; DE MAGALHAES et al., 2011; GUEHI et al., 2007; GUEHI et al., 2008; HANSEN und WELTY, 1970; HANSEN et al., 1973; JAYEOLA und OLUWADUN, 2010; NILES, 1981). Über die Entstehung von ZEA in Kakao ist bisher

nichts bekannt. Ob oder inwieweit einige dieser Pilze an der Entstehung von ZEA beteiligt sind, ist nicht erwiesen.

2.9 Gesetzliche Grundlagen für Höchstgrenzen für ZEA in Deutschland und der Europäischen Union

Bezüglich der in Lebensmitteln geltenden Höchstmengen für ZEA wurde die national in Deutschland geltende Mykotoxin-Höchstmengenverordnung vom 02. Juni 1999, in der auch Regelungen zu ZEA zu finden waren, im Jahre 2010 aufgehoben (Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln und zur Änderung oder Aufhebung anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen, 19. März 2010). Auch die nationale Diät-Verordnung wurde 2010 überarbeitet, wobei ZEA nicht mehr aufgeführt wird. Grund hierfür war die Festlegung von Höchstmengen durch die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006, die alle konkurrierenden nationalen Regelungen unwirksam werden ließ. In der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln (EU-weit gültig) sind nun aktuelle Höchstmengen für ZEA in Getreide und Getreideprodukte zu finden. Diese Verordnung wurde zuletzt am 28. September 2007 durch die Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission bezüglich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen geändert. Es wurden hiermit einige ZEA-Höchstmengen erhöht, so zum Beispiel auch die Höchstmenge für ZEA in raffiniertem Maisöl. Diese war zuvor auf 200 µg/kg festgesetzt, seit 2007 gilt ein Höchstwert von 400 µg/kg.

Die aktuell geltenden Höchstwerte aus der Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen sind auszugsweise in Tabelle 12 zusammengefasst.

Die Festsetzung für Höchstmengen von Mykotoxinen in Lebensmitteln beruht teilweise auf toxikologischen Studien und Bewertungen. Einige internationale Gremien haben sich damit befasst. So wurde im Jahr 2000 für ZEA ein vorläufiger TDI (tolerable daily intake) von 0,5 µg/kg KGW pro Tag festgesetzt (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2000). Der SCF (Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins Part 2:

Zearalenone (ZEA) 22. Juni 2000, SCF/CF/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final) ermittelte im selben Jahr durch die Wahl eines höheren Sicherheitsfaktors einen TDI von 0,2 µg/kg KGW pro Tag. Im Jahr 2011 wurde von dem Ausschuss für Schadstoffe in der Nahrungsmittelkette (Panel on Contaminants in the Food Chain) der EFSA ein TDI von Zearalenon von 0,25 µg/kg Körpergewicht festgesetzt (EFSA, 2011) (siehe Kapitel 2.4). Die tatsächlich festgelegten Höchstmengen sind unter Berücksichtigung des TDI häufig so hoch, dass bei Ausschöpfung der Höchstmenge tatsächlich der TDI überschritten würde.

Für ZEA in Milchprodukten gibt es keine rechtlichen Regelungen, genauso wenig wie für ZEA in Kakao oder Kakaoprodukten. In der national geltenden Kakao-Verordnung (Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse) sind ausschließlich Bestimmungen über Zutaten, Kennzeichnung oder Verkehrsverbote dieser Produkte aufgeführt.

Tabelle 12: Auszug aus der Verordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen

Toxin	Produkt	Höchstmenge (µg/kg)
ZEA	Unverarbeitetes Getreide außer Mais	100
	Unverarbeiteter Mais außer unverarbeitetem Mais, der zur Verarbeitung durch Nassmahlen bestimmt ist	350
	Zum unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide, Getreidemehl, als Enderzeugnis für den unmittelbaren Verzehr vermarktete Kleie und Keime	75
	Raffiniertes Maisöl	400
	Brot (einschließlich Kleingebäck), feine Backwaren, Kekse, Getreide-Snacks und Frühstückscerealien, außer Mais-Snacks und Frühstückscerealien auf Maisbasis	50
	Für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmter Mais, Snacks und Frühstückscerealien auf Maisbasis	100
	Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder	20

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben.

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Mykotoxinstandard

Zearalenon

(Sigma Aldrich GmbH, Z-2125)

3.1.2 Puffer und Lösungen

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

Enzymsubstrat/Chromogenlösung:

Substratlösung für Meerrettichperoxidase: 0,2 mol/l Citratpuffer (pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l H_2O_2

Chromogenlösung (Tetramethylbenzidinlösung: 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung in neun Teilen Methanol und einem Teil Aceton)

Gebrauchsfertig: 20 Teile Citratpuffer mit H_2O_2 -Zusatz und ein Teil Tetramethylbenzidinlösung

1 mol/l Schwefelsäure (H_2SO_4)

0,01 mol/l phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2: 0,01 mol/l Phosphatpuffer mit 0,12 mol/l Natriumchlorid)

5 % Acetonitril/PBS (pH 7,4)

1 % bzw. 2 % Casein-PBS-Lösung (1 g bzw. 2 g Natrium-Caseinat in 100 ml PBS)

10 % Chloramin/A. dest.-Lösung

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20)

3 mol/l Natronlauge

3.1.3 Immunreagenzien

Die folgenden Immunreagenzien sind im Rahmen von Forschungsprojekten an der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität entwickelt worden (außer den Immunaффinitätssäulen, welche kommerziell erworben wurden) und standen für die eigenen Arbeiten zur Verfügung.

Zearalenon-EIA:

Immunaффinitätssäulen: ZearalaTest™, G1026 (VICAM®); Easi-Extract® Zearalenone (R-Biopharm Rhône LTD)

Antikörper: *polyklonal*: Antiserum gegen Zearalenon (USLEBER et al., 1992; SEIDLER, 2007), Kreuzreaktionen siehe Tabelle 9 und Tabelle 13 (IgG-Rohfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt)

Konjugat: Zearalenon-Oxim-Aktivester-Meerrettichperoxidase-Konjugat (ZEA-Oxim-AE-HRP) (USLEBER et al., 1992)

Die Kreuzreaktivität der ZEA-Analoga (α -Zearalenol, β -Zearalenol, Zearalanon, α -Zearalanol, β -Zearalanol) wurde bereits in einer früheren Dissertationsarbeit überprüft (SEIDLER, 2007). Die ZEA-Analoga wurden im Enzymimmuntest eingesetzt und die Kreuzreaktivität mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Kreuzreaktion (\%)} = \frac{50\% - \text{Dosis}[ZEA] \times \text{Molekulargewicht}}{50\% - \text{Dosis}[Testtoxin] \times \text{Molekulargewicht}} \times 100$$

Anhand Tabelle 13 werden die relativen Kreuzreaktionen des ZEA-Antiserums von Kanichen Nummer 14 ersichtlich. Dieses Antiserum wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 13: Relative Kreuzreaktionen des ZEA-Antiserums (Pool Kaninchen 14) mit strukturverwandten Analoga (nach SEIDLER, 2007)

Toxin	Molekulargewicht	Relative Kreuzreaktion (%)
Zearalenon	318,4	100
α -Zearalenol	320,4	26
β -Zearalenol	320,4	17
Zearalanon	320,4	41
α -Zearalanol	322,4	11
β -Zearalanol	322,4	17

3.1.4 Chemikalien und Biochemika

Aceton reinst	(Merck KGaA, 1.00013)
Acetonitril reinst	(Merck KGaA, 1.15500)
Acetonitril	(Merck KGaA, 1.00030)
Ammoniumcarbamat	(Merck KGaA, 1.101134)
Casein-Natriumsalz	(Sigma Chemie GmbH, C-8654)
Chloramin T Trihydrat	(Merck KGaA, 1.02424)
Citronensäure-1-monohydrat	(Merck KGaA, 1.00244)
di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.06586)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck KGaA, 1.04877)
Kaliumhydroxidplättchen	(Merck KGaA, 1.05021)
Meerrettichperoxidase	(Roche Diagnostics, 814407)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06007)
Methanol	(Merck KGaA, 1.06009)
Natriumcarbonat	(Merck KGaA, 1.06392)
Natriumchlorid	(Merck KGaA, 1.06404)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck KGaA, 1.06329)
n-Hexan	(Merck KGaA, 1.04368)
Salzsäure	(Merck KGaA, Riedel-de-Haen GmbH, 30721)
Schwefelsäure	(Merck KGaA, 1.00731)

3. MATERIAL UND METHODEN

Stickstoff	(Messer GmbH, 0335)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	(Sigma Chemie GmbH, T-2885)
Tween 20	(Sigma Chemie GmbH, P-1379)
Wasserstoffperoxid	(Merck KGaA, 1.07209)

Alle verwendeten Reagenzien lagen mindestens in der Reinheitsstufe p. a. vor.

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

C-18-Kartuschen, Discovery® DSC-18	
Supelco® Analytical, 3 ml Tubes, 500 mg	(Sigma Aldrich GmbH, U-25603)
Erlenmeyerkolben in verschiedenen Größen	
Glas-Pasteur-Pipetten, 230 mm	(VWR™ international 612-1702)
Glaspipetten 2 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl	(Hirschmann® Techcolor)
Heiz- und Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	(Bandelin electronic GmbH & Co. KG)
Heizrührer MR 3001	(Heidolph GmbH)
Kern FKB Waage	(Kern GmbH)
Kühl- und Gefrierschränke	(Liebherr Premium)
Laborschüttler julabo sw-20C	(julabo Labortechnik GmbH)
Laborschüttler	(INFORS AG)
Latexhandschuhe	(VWR™ international)
Magnetmix 2070 Assistant	(Karl Hecht GmbH & Co. KG)
Mikrotiterplattentaumelgerät Polymax 1040	(Heidolph GmbH)
Parafilm „M“® Laboratory Film	(Pechiney Plastic Packaging)
pH-Indikatorstäbchen Neutralit®, pH 5,0-10,0	(Merck KGaA, 1.09533)
pH-Meter inoLab Level 1 mit Sen Tix HW Elektrode	(WTW GmbH)
Pipettierhelfer accujet®	(Brand GmbH & Co. KG)
Sarstedt Gefäße 120 ml	(Sarstedt AG & Co.)
Sartorius Waage LA 230S	(Sartorius AG)
Sartorius Waage BP 4100S	(Sartorius AG)
Ultraschallbad Bandelin Sonorex TK52	(MAGV GmbH)
Variable Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)

3. MATERIAL UND METHODEN

Variable 12-Kanal-Pipette 10-100 µl, 30-300 µl	(Eppendorf Gerätebau GmbH)
Vortex Genie 2	(Scientific Industries Inc.)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	(Heraeus-Christ GmbH)
Vakuum-Box für Extraktionssäulen	
Supelco [®] Analytical Visiprep [™] DL	(Sigma-Aldrich Biotechnology LP)
Vakuum-Rotationsverdampfer	(Heidolph Laborota 4003)

3.1.6 Enzymimmuntests

Computer	(Dell, Gericom)
ELISA-Auto-Reader Tecan Sunrise	(Tecan GmbH, Crailsheim)
ImmunoPlate Maxisorb	(Nunc GmbH, 439454)
Photometer UV 1601	(Shimadzu Deutschland GmbH)
Datenverarbeitungssoftware Magellan 6.6	(Tecan GmbH)

Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte unter Verwendung einer Standard-Tabellenkalkulationssoftware (Microsoft Excel).

3.1.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HPLC-Anlage (Dionex), bestehend aus:

Vorsäule:	Licrospher [®] 100 RP 18 (5 µm)	
	liCroCart 4x4 mm	(Merck KGaA, 1.50957)
Säule:	Licrospher [®] 100 RP 18 (5 µm)	
	liCroCart 125x4 mm	(Merck KGaA, 1.50943)
Pumpenserie P 580		(DIONEX GmbH)
Probengeber Modell ASI 100/ASI 100 T		(DIONEX GmbH)
Fotodiode PDA 100 Array detector		(DIONEX GmbH)
Fluoreszenzdetektor RF 2000		(DIONEX GmbH)
Säulenthermostat STH 583		(DIONEX GmbH)
Datenauswertungssystem		(DIONEX, Chromeleon)
Fraktionkollektor 202		(Gilson SAS)

3.1.8 Probenmaterial

Im Zeitraum von April 2010 bis Januar 2011 wurden in mittelhessischen und überregionalen Läden (Supermärkte, Reformhäuser, Naturkostläden) insgesamt 162 (Tabelle 14; Abbildung 4) verschiedene Lebensmittel gekauft. Die Proben wurden gemäß der ADV-Kodierungskataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittelmonitoring (Katalog Nr. 3, Version 1.21: Matrixcodes; Stand: 01.01.2011) gruppiert. Diese Codes sind in Fachkreisen als Matrix-Codes bekannt.

Tabelle 14: Produktgruppen und Anzahl der untersuchten Proben

Probenart	Matrix-Code	n
Pflanzliche Öle	130...	31
Schlagsahne	020...	38
Milchmischerzeugnisse, Sahneerzeugnisse mit Kakao/Schokolade	021...	30
Puddinge, Desserts	210...	63

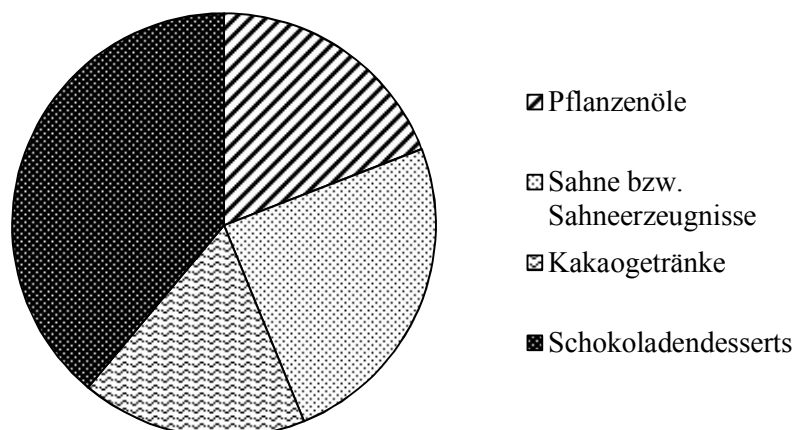


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der verschiedenen Produktgruppen an der Gesamtzahl der untersuchten Lebensmittelproben

3. MATERIAL UND METHODEN

Zur detaillierten Zusammensetzung der Lebensmittelproben innerhalb der einzelnen Produktgruppen siehe Abbildungen 5, 6 und 7.

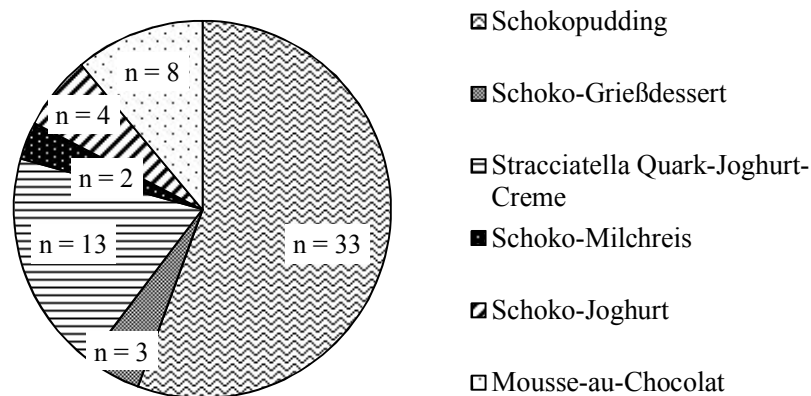


Abbildung 5: Zusammensetzung der Produktgruppe „Schokoladendesserts“

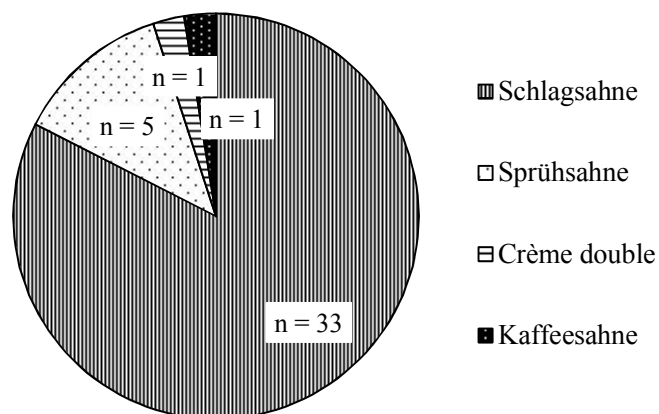


Abbildung 6: Zusammensetzung der Produktgruppe „Sahne“

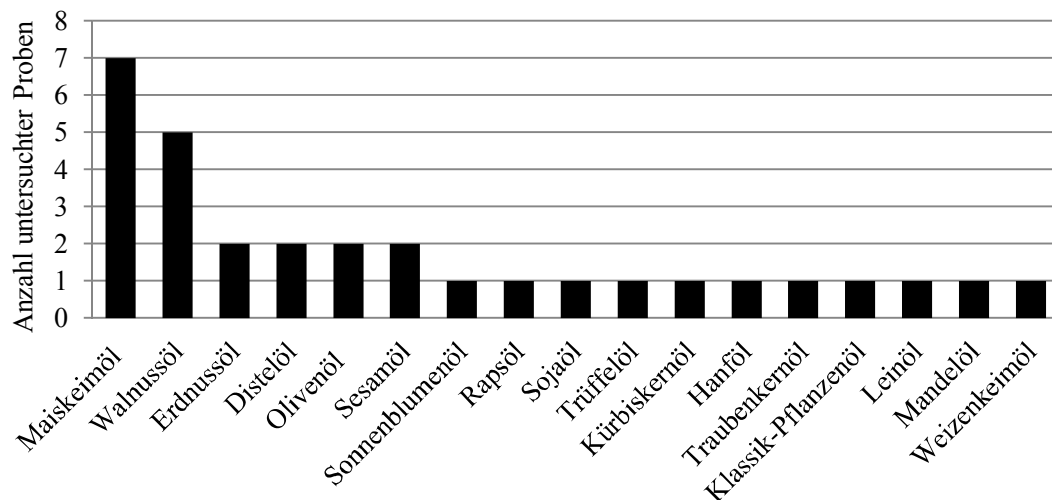


Abbildung 7: Zusammensetzung der Produktgruppe „Pflanzenöle“

Die Proben der Produktgruppe „Milchmischgetränke“ bzw. „Kakaogetränke“ ($n = 28$) bestanden aus einer Vielfalt aus Erzeugnissen aus frischer Milch, ultrahocherhitzter Milch, laktosefreier Milch und fettarmer Milch mit unterschiedlichen Kakaoanteilen aus deutschlandweiten Molkereien. Auch ein Hafer- sowie ein Sojagetränk wurden untersucht.

3.2 Methoden

Die eigenen Untersuchungen der genannten Probenmaterialien auf ZEA wurden grundsätzlich mittels Enzymimmunttest-Verfahren (Enzyme Immunoassay, EIA) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein quantitatives enzymimmunchemisches Verfahren im Mikrotitersystem zur Summenbestimmung des Gehalts an ZEA in Ölen, Sahne und Kakaoprodukten. Verwendet wurde ein bereits für Lebensmittelproben unterschiedlicher Matrices etabliertes EIA-Verfahren (SEIDLER, 2007), welches im Rahmen dieser Dissertationsarbeit für die genannten Produktgruppen optimiert wurde.

Ein Teil der Proben wurde zusätzlich mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2.1 Etablierung der enzymimmunologischen Untersuchungsverfahren für den Nachweis von ZEA

3.2.1.1 Herstellung und Überprüfung des Toxinstandards

Lyophilisierter ZEA-Standard (Sigma zearalenone, Z 2125) mit einem nominellen Gehalt von 1 mg wurde in 1 ml Acetonitril gelöst. Die tatsächliche Konzentration dieser Stammlösung wurde mittels Zwischenverdünnungen in Acetonitril (z. B. 1 Teil Stammlösung + 49 Teile Acetonitril, nominelle Konzentration $c = 20 \mu\text{g/ml}$) nach Aufnahme eines UV-Spektrums (190-500 nm) im Absorptionsmaximum (274 nm) überprüft. Ebenso wurden Zwischenverdünnungen der Konzentrationen 10 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt und gleichermaßen überprüft. Der molare Extinktionskoeffizient für Zearalenon in Acetonitril bei 274 nm beträgt 1260 m^2/mol , das Molekulargewicht von ZEA beträgt 318,1 g/mol (MAJERUS et al., 2009). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mittels dieser beiden Konstanten:

$$c = \frac{E \times M}{\epsilon}$$

E	Extinktion bei 274 nm
M	Molekulargewicht
ϵ	molekularer Extinktionskoeffizient
c	Konzentration

Die tatsächliche Konzentration der ZEA Stammlösung wurde anhand dieser Messung ermittelt. Durch Verdünnung mit Acetonitril/PBS (5:95; v/v) wurden Arbeitsstandardlösungen hergestellt. Als Negativkontrolle (Blank, BLK) wurde Acetonitril/PBS (5:95; v/v) benutzt. Diese Standardlösungen wurden nicht länger als einen Tag verwendet.

3.2.1.2 Überprüfung und Untersuchungen zur Optimierung des Testsystems für den Nachweis von Zearalenon

Der Nachweis von ZEA erfolgte mit einem kompetitiven direkten Enzymimmuntest. Dabei konkurriert freies Toxin mit enzymmarkierten Toxin (ZEA-Oxim-HRP) um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Ungebundene Reagenten werden durch Waschschriffe vor dem Zusatz von Enzymsubstrat entfernt. Die Farbreaktion verhält sich umgekehrt proportional zur freien Toxinkonzentration.

Durchführung:

Mikrotiterplatten wurden mit Antiserum gegen ZEA beschichtet (1:6000 in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6; 100 µl/Kavität). Diese wurden über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und zur weiteren Aufbewahrung (bis zu vier Wochen) bei 4 °C gelagert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden freie Bindungsstellen mit 2 % Casein/PBS (200 µl/Kavität) für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung und Entfernen der Flüssigkeit („Ausschlagen“/„Trockenschlagen“) wurde im Vierfachansatz ZEA-Standard in 5 % Acetonitril/PBS bzw. 10 % Methanol/PBS zugegeben (sechs Toxinstandards von 0,00977 bis 10 ng/ml). Gleichzeitig wurden Probenlösung sowie Toxin-HRP-Konjugat (1:150000 in 1 % Casein/PBS) auf die Platten pipettiert (je 50 µl/Kavität) und diese zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei leichter Bewegung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff zur Entfernung ungebundener Reagenzien und „Trockenschlagen“ der Platten wurde Substrat/Chromogenlösung (100 µl/Kavität) zugegeben und die Umsetzungsreaktion nach etwa zehn Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Auswertung erfolgte mittels Magellan-Software. Der Extinktionswert des Zearalenon-freien Ansatzes („Leerwert“, „Blank“, B_0) wurde gleich 100 % gesetzt und die den jeweiligen Zearalenonkonzentrationen entsprechenden (niedrigeren) Extinktionswerte (B) als Prozentwerte des „Leerwertes“ ($B/B_0 \times 100$) ausgedrückt.

Um Fehlinterpretationen vorzubeugen, wurden bei der Auswertung von Probenmesswerten anhand der erstellten Standardkurven nur Werte berücksichtigt, die in Extinktionswerte von mehr als 30 % und weniger als 80 % des Zearalenon-freien Ansatzes resultierten, entsprechend dem quasi-linearen Bereich der Standardkurven. Als Maß für die

3. MATERIAL UND METHODEN

Empfindlichkeit des Enzymimmuntests wurde der 50 %-Wert bestimmt, d. h. diejenige Zearalenon-Konzentration, welche die Bindung des enzymmarkierten Toxins an die Antikörper um 50 % reduzierte.

Um die Empfindlichkeit des Testsystems zu optimieren, wurden zu Beginn der Dissertationsarbeit unterschiedliche Konzentrationen des Antiserums getestet (1:4000; 1:6000; 1:8000; jeweils in Bicarbonatpuffer, pH = 9,6). Als optimal wurde diejenige Konzentration angesehen, welche bei einer Inkubationszeit von zehn Minuten einen Extinktionswert des toxinfreien Ansatzes von 0,8-1,2 sowie den größten Extinktionsunterschied (B/B_0) zwischen toxinfreiem und toxinhaltigem Ansatz ergab.

3.2.1.2.1 Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens

Um die Reproduzierbarkeit des Enzymimmuntests sowie die Sensitivität zu überprüfen, wurden die Testparameter „Nachweisgrenze“ und „50 % Dosis“ der Standardkurve herangezogen, wobei jeweils eine Vierfachbestimmung der Standardkonzentration vorlag. Dazu wurden 91 Standardkurven ausgewertet. Als Nachweisgrenze wurde jeweils die 80 % Dosis der Standardkurve gewertet.

3.2.2 Untersuchung von Probenmaterialien

Die Herstellung der Standardgebrauchslösungen und die Aufbereitung der Proben erfolgte täglich frisch. Grundsätzlich wurden alle Standardlösungen und Probenverdünnungen (typischerweise z. B. 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) im Vierfachansatz in den Enzymimmuntest eingesetzt. Der Umfang der Probenmaterialien wurde bereits in Kapitel 3.1.8 dargestellt.

3.2.2.1 Vorbereitung und Extraktion

Speiseöle wurden ohne weitere Vorbehandlung untersucht. Ein Teil der Sahneproben wurde vor der Extraktion aufgeschlagen, ein anderer Teil dieser Produktgruppe wurde zunächst für 15 Minuten bei 4 °C (3000 x g) zentrifugiert, zwei Gramm Rahm abgenommen und dieser zur Untersuchung im EIA verwendet. Die verbleibenden

3. MATERIAL UND METHODEN

Sahneproben wurden nicht vorbehandelt. Auch die Schokoladendesserts wurden ohne Vorbehandlung extrahiert.

Angewandt wurde eine alkalische Extraktion von Zearalenon in Anlehnung an eine von MAJERUS et al. (2009) publizierte Methode. Diese Methode wurde für Öle entwickelt, hier wurde sie jedoch auch für die anderen fettreichen Probenmaterialien adaptiert. Zur Extraktion wurden zwei Gramm der Lebensmittelprobe in ein Kunststoff-Zentrifugenröhrchen eingewogen, zwei Milliliter n-Hexan sowie 20 ml alkalisches Methanol-Wasser-Gemisch (Methanol/Ammoniumcarbamatlösung, 90/10; v/v) zugegeben und 15 Minuten bei 200 Umdrehungen pro Minute (upm) auf einem Laborschüttler extrahiert. Anschließend wurde das Extraktionsgemisch zentrifugiert (10 Minuten, 3000 x g, 20 °C). Von der wässrigen Phase wurden 12 ml abgenommen, in einen 25 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und diese mit zweimolarer Salzsäurelösung auf einen pH < 7 eingestellt. Dies wurde mittels Neutralit[®]-Teststäbchen (pH 5-10) kontrolliert. Fünf Milliliter dieses Extrakts wurden bei 40 °C im 50 ml Rundkolben getrocknet und der Rückstand anschließend mit zwei Milliliter Acetonitril/A. dest. (25/75; v/v) resuspendiert. Vor der Untersuchung im Enzymimmuntest wurde gut gemischt (gevortext), wobei der Rundkolben für einige Minuten in ein Ultraschallwasserbad gehalten wurde, um das Mykotoxin komplett in Lösung zu bringen und Rückstände vom Glas zu lösen. Weiterhin wurde ein Volumenteil des Überstandes mit vier Teilen PBS (pH 7,4) verdünnt. Dies entspricht der ersten im Enzymimmuntest eingesetzten Extraktverdünnung. Der aus Extraktion und Extraktverdünnung resultierende Probenfaktor beträgt somit 20. Höhere Verdünnungen wurden durch Mischen der ersten Verdünnungsstufe mit Acetonitril/PBS pH 7,4 (5/95; v/v) hergestellt.

Der Vorteil dieser Methode ist die hervorgerufene (reversible) Spaltung des Laktonringes von Zearalenon im alkalischen Milieu. Durch diese Spaltung wird ZEA relativ polar. So wird das Problem umgangen, ZEA aus unpolaren Stoffen in eine wässrige Phase zu extrahieren. Anhand Abbildung 8 wird deutlich, dass unpolares Zearalenon durch die Zugabe des alkalischen Methanol-Wasser-Gemisches polar wird (Spaltung des Laktonringes), somit in die wässrige Phase übergehen kann und durch anschließende Neutralisierung mittels Salzsäure wieder unpolar wird (Laktonring wird wieder geschlossen).

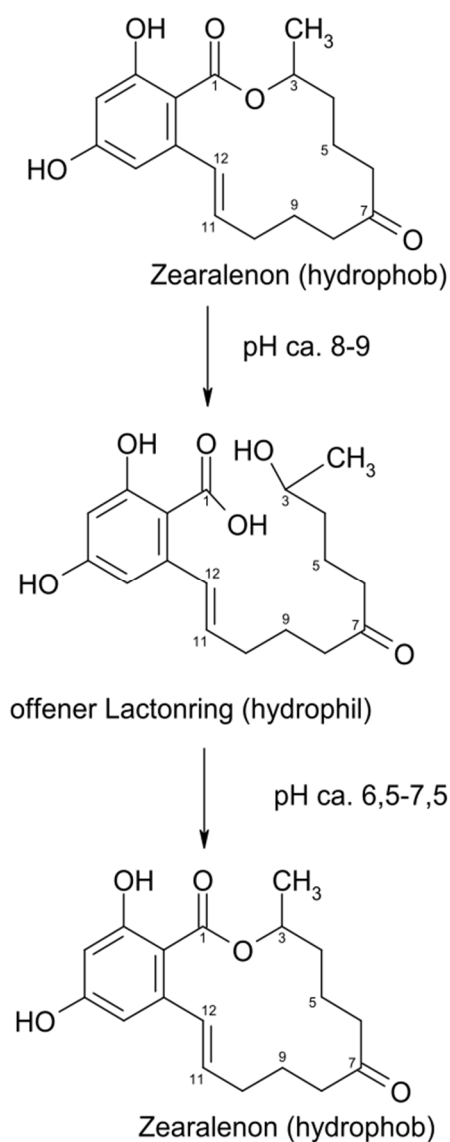


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Spaltung und Schließung des Laktonringes von ZEA bei der alkalischen Extraktion

3.2.2.1.1 Aufreinigung der Proben mittels C-18-Kartuschen

Um den Extrakt der kakaohaltigen Proben weiter aufzureinigen wurden bei einem Teil der Proben weitere Schritte der Extraktion eingeführt.

Mittels C-18-Kartuschen wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt (solid phase extraction; SPE) (Siehe Kapitel 2.7.1). Diese stationäre Phase besteht bei den hier verwendeten Kartuschen (Discovery® DSC-18 Supelco® Analytical; Sigma Aldrich

3. MATERIAL UND METHODEN

GmbH) aus Kieselgel und Octadecylsilan (mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert). Diese beiden Stoffe reagieren, dadurch wird die stationäre Phase unpolar. Diese Methode der Festphasenextraktion nennt man Umkehrphasenchromatographie (reverse phase chromatography, RP) (ENGELHARDT, 1986; LINDSAY, 1996; www.sigmaaldrich.com).

Die Anwendung der C-18-Kartuschen für die Extraktion von Zearalenon aus kakaohaltigen Produkten erfolgte folgendermaßen:

Anfangs wurde die unter 3.2.2.1 beschriebene Extraktion der Proben durchgeführt. Jedoch wurden von dem wässrigen Methanol-Wasser-Gemisch zehn Milliliter anstatt der erwähnten 12 ml abgenommen. Der pH wurde auch auf < 7 eingestellt und 20 ml A. dest. wurden zugegeben. Die C-18-Kartuschen wurden auf eine Vakuumkammer aufgesetzt (Supelco) und zunächst zur Konditionierung fünf Milliliter A. dest. zugegeben, anschließend fünf Milliliter Methanol und danach erneut fünf Milliliter A. dest. Daraufhin wurden die 30 ml Probenlösung (30 %iges Methanol-Gemisch) über die Säule befördert. Zum Auswaschen der Kontaminanten wurden fünf Milliliter A. dest. verwendet. Zum Schluss wurde als Lösungsmittel für Zearalenon fünf Milliliter Methanol/A. dest. (70/30; v/v) benutzt.

Zur Untersuchung des aufkonzentrierten Extrakts wurde ein Volumenteil des Extrakts mit sechs Teilen PBS (pH 7,4) verdünnt, sodass eine 10 %ige Methanol/PBS-Lösung entstand. Höhere Verdünnungen wurden durch Mischen der ersten Verdünnungsstufe mit Methanol/PBS (10/90; v/v) hergestellt. Auch die Standardkurven des Enzymimmuntests, welcher zum Nachweis für die so extrahierten Proben angewandt wurde, wurden mit Methanol/PBS (10/90; v/v) anstatt wie üblich mit Acetonitril/PBS (5/95; v/v) hergestellt.

3.2.2.1.2 Aufreinigung der Proben mittels Immunaффinitätssäulen

Einige Probenextrakte wurden zusätzlich über Immunaффinitätssäulen gereinigt (ZearalaTestTM G1026 (VICAM®); Easi-Extract® Zearalenone (R-Biopharm Rhône LTD)). Bei dieser erweiterten Form der Extraktion der Proben (siehe Kapitel 2.7.1) wurde zunächst die Extraktion mittels C-18-Kartuschen durchgeführt (siehe 3.2.2.1.1). Von dem Eluat (Methanol/A. dest., 70:30; v/v) wurden vier Milliliter abgenommen und mit 16 ml PBS vermengt. Die Immunaффinitätssäulen wurden auf eine Vakuumkammer aufgesetzt

3. MATERIAL UND METHODEN

(Supelco), der in den Säulen enthaltene Puffer (Konservierungsflüssigkeit) ablaufen gelassen und anschließend 20 ml Probenextrakt über die Säule gegeben (Fließgeschwindigkeit maximal ein Tropfen pro Sekunde). Als Waschschrift wurden anschließend 20 ml A. dest. verwendet (ein bis zwei Tropfen pro Sekunde). Zur Lösung von ZEA von den Säulen wurde daraufhin mit zwei Millilitern reinem Methanol eluiert und die Säule trocken gesaugt.

3.2.2.2 Untersuchung der Probenmaterialien mittels EIA

Zur Probenuntersuchung wurde ein kompetitiver direkter Enzymimmunttest verwendet. Nach der Extraktion (siehe 3.2.2.1) wurden die Proben, wie schon in 3.2.1.2 beschrieben, in den EIA eingesetzt.

3.2.2.3 Untersuchung der Probenmaterialien mittels HPLC

Zur Überprüfung der eingesetzten EIA-Methoden wurde ein Teil der Proben zusätzlich mittels HPLC untersucht.

Methode 1 (alkalische Extraktion und IAC)

Verschiedene Proben (Kakaogetränke, Schokoladensahne und Maiskeimöl) wurden wie folgt extrahiert und mittels HPLC untersucht:

Vier Gramm Probe wurde im Zentrifugengefäß eingewogen, vier Milliliter n-Hexan (Merck KGaA 1.04368) zugegeben, ebenso wie 40 ml Methanol/Ammoniumcarbamatlösung (90:10; v/v). Das Gemisch wurde etwa 15 Minuten bei 200 upm auf einem Laborschüttler extrahiert. Anschließend wurde das Probengemisch zentrifugiert (10 Minuten, 3000 x g, 20 °C). 30 ml des methanolischen Extrakts wurden mit Salzsäure (2 mol/l) auf einen pH-Wert < 7 eingestellt und im Rotationsverdampfer getrocknet. Der Rückstand wurde mit einem Milliliter reinem Acetonitril gelöst und mit 19 ml PBS (pH 7,4) aufgefüllt, sodass eine 5 %ige Acetonitril-Lösung entstand. Anschließend wurden die Proben mittels Immunaффinitätssäulen weiter aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen zunächst mit 20 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und daraufhin 20 ml

3. MATERIAL UND METHODEN

Probenextrakt über die Säulen gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Immunaффinitätssäulen erneut gewaschen (20 ml A. dest.) und danach getrocknet indem Luft durch die Säulen gesaugt wurde. Zum Eluieren von Zearalenon wurden zwei Milliliter reines Acetonitril verwendet (in Eppendorfhütchen aufgefangen). Zur vollständigen Gewinnung des Eluats wurde erneut Luft durch die Säulen strömen gelassen. Das Eluat wurde danach zentrifugiert (fünf Minuten, 13000 upm), das Lösungsmittel dann im 40 °C warmen Wasserbad unter Stickstoffstrom abgedampft und der Rückstand daraufhin in 300 µl Fließmittel (Acetonitril/A. dest., 48:52; v/v) aufgenommen. Anschließend wurde zur vollständigen Auflösung von ZEA das Gemisch geschüttelt (gevortext), eine Minute in ein Ultraschallwasserbad verbracht und erneut geschüttelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels HPLC unter Einhaltung folgender Analysebedingungen:

HPLC-Analysebedingungen

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
Mobile Phase:	Acetonitril/A. dest. (48:52; v/v)
Säulentemperatur:	30 °C
Flussgeschwindigkeit:	0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektion:	Fluoreszenzdetektor, λ_{ex} 274 nm, λ_{em} 446 nm
Retentionszeit für ZEA:	~ 6,5 min.

Eine Überprüfung der HPLC-Methode wurde durch Verwendung künstlich mit ZEA kontaminierten Probenmaterials durchgeführt.

Methode 2 (alkalische Extraktion und SPE und IAC)

Verschiedene Proben (Kakaogetränke, Schokoladensahne, Schokoladendesserts und Maiskeimöl) wurden wie folgt extrahiert und mittels HPLC untersucht:

Zwei Gramm der Probe wurden im Zentrifugengefäß eingewogen und zwei Milliliter n-Hexan sowie 20 ml alkalisches Methanol-Wasser-Gemisch (neun Volumenteile Methanol, ein Volumenteil Ammoniumcarbamatlösung) zugegeben. Das Probengemisch wurde 15 Minuten mittels eines Laborschüttlers extrahiert. Zur Phasentrennung wurde anschließend für zehn Minuten zentrifugiert (3000 x g; 20 °C). Von der oberen wässrigen Phase wurden zehn Milliliter abgenommen, mit Salzsäurelösung auf einen pH < 7 eingestellt und dann 20 ml A. dest. zugegeben. Wie unter 3.2.2.1.1 beschrieben, wurde die Probenextraktlösung über C-18-Kartuschen weiter gereinigt. Eluiert wurde mit fünf Milliliter Methanol/A. dest. (70:30; v/v). Vier Milliliter dieses Eluats wurden abgenommen und mit 16 ml PBS vermischt. Diese Lösung wurde, wie unter 3.2.2.1.2 beschrieben, durch Anwendung von Immunaффinitätssäulen aufgereinigt und mittels zwei Millilitern Methanol eluiert. Das Lösungsmittel (Methanol) wurde anschließend unter Stickstoffstrom im 40 °C warmen Wasserbad abgeblasen und der Rückstand in 125 µl Fließmittel gelöst. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels HPLC unter Einhaltung folgender Analysebedingungen:

HPLC-Analysebedingungen

Stationäre Phase:	Trennsäule RP 18 125 mm x 4 mm (5 µm) mit Vorsäule RP 18 4 mm x 4 mm (5 µm)
Mobile Phase:	Acetonitril/A. dest. (40:60; v/v)
Säulentemperatur:	30 °C
Flussgeschwindigkeit:	0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Detektion:	Fluoreszenzdetektor, λ_{ex} 274 nm, λ_{em} 446 nm
Retentionszeit für ZEA:	~ 12,6 min.

3. MATERIAL UND METHODEN

Eine Überprüfung der HPLC-Methode wurde durch Verwendung künstlich mit ZEA kontaminierten Probenmaterials durchgeführt.

Die Ergebnisse der HPLC wurden mit denjenigen des Enzymimmuntests verglichen.

3.2.2.3.1 HPLC-Fraktionierung

Um die Ergebnisse der HPLC und die der Enzymimmuntests zu überprüfen wurde eine HPLC-Fraktionierung durchgeführt, d. h. die ZEA-reiche Fraktion einer Probe wurde während des Laufs der HPLC aufgefangen und anschließend im EIA untersucht. Dabei wurde eine Schokoladenpudding-Probe wie in 3.2.2.3 (Methode 2 (alkalische Extraktion und SPE und IAC)) zweimal extrahiert und in das HPLC-System eingesetzt. Jede dieser beiden Proben wurde minutenweise separat aufgefangen und somit getrennt (fraktioniert). Da die Retentionszeit von ZEA, wie oben erwähnt, bei etwa 12,6 Minuten lag, waren die Minutenfraktionen elf, zwölf und 13 von Interesse. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 0,9 ml/min. Somit wurden insgesamt 2,7 ml Eluat pro Probe erhalten. Im Enzymimmuntest wurden die Fraktionen beider Extraktionen zusammen untersucht. Folglich lagen 5,4 ml Untersuchungsmaterial vor, welches zunächst unter Stickstoffstrom zur Trocknung abgedampft wurde. Der Rückstand wurde in Methanol/PBS (10:90; v/v) gelöst und im EIA untersucht. Hierzu wurden die Standardkurven des EIA in 10 % Methanol/PBS-Lösung angelegt.

3.2.2.4 Vergleichsuntersuchungen von Schokoladendesserts mittels LC-MS/MS

Zur Absicherung der Befunde der eigenen Untersuchungen wurden drei verschiedene Proben (Schokoladendesserts), welche im EIA positiv auf ZEA getestet wurden, in das Nationale Referenzlabor für Mykotoxine (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR; Dr. Horst Klaffke) in Berlin geschickt und dort mittels LC-MS/MS untersucht. Die ermittelten Ergebnisse wurden der Professur für Milchwissenschaften mitgeteilt.

3.2.3 Laborvergleichsstudie

Zur Validierung der in dieser Arbeit angewandten Methoden beteiligte sich die Professur für Milchwissenschaften der JLU Gießen an einer Laborvergleichsstudie zum Nachweis von ZEA in Speiseölen. Durchgeführt wurde diese Studie von der BAM (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) Anfang des Jahres 2011. Beteiligt waren zehn verschiedene deutsche Laboratorien. Da jedem Laboratorium die Auswahl des Analysenverfahrens freigestellt war, sollte der Ringversuch auch zu einem Vergleich aktuell verwendeter Verfahren beitragen, ohne den Anspruch auf eine Methodenvergleichsstudie zu erheben. Es wurden insgesamt drei verschiedene Maiskeimöle für die Untersuchung im Ringversuch ausgewählt. Bei diesen Proben handelte es sich um natürlich kontaminierte Proben. Eine der Proben wurde zusätzlich künstlich mit ZEA dotiert. Zusätzlich zu den Ölproben wurde eine Lösung von ZEA in Acetonitril mit definierter Konzentration (den Teilnehmern unbekannt) zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Laborvergleichsstudie wurden im März 2011 bekanntgegeben. Für die EIA-Untersuchungen wurde eine modifizierte Extraktion nach MAJERUS et al. (2009) (siehe Kapitel 3.2.2.1) verwendet, wobei eine weitere Aufreinigung mit C-18-Kartuschen (52603-U, Supelco) durchgeführt wurde. Das Eluat wurde abgedampft, mit 500 µl Acetonitril/A. dest. (48/52; v/v) gelöst und in weiteren Verdünnungen im EIA eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.1.2). Die anderen neun Laboratorien verwendeten HPLC mit Fluoreszenzdetektion (Ex: 274 nm; Em: 446 nm) bzw. HPLC-MS/MS. Bei Anwendung der HPLC-MS/MS wurde sowohl ohne als auch mit internen Standards gearbeitet, wobei als interner Standard ausschließlich U-[¹³C₁₈]-ZEA zum Einsatz kam.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung des Untersuchungsverfahrens

4.1.1 Überprüfung des Toxinstandards

Die Messung des Spektrums des in Acetonitril gelösten ZEA ergab ein typisches Spektrum mit den erwarteten Absorptionsmaxima bei 236, 274 und 316 nm. Hinweise auf Verunreinigungen ergaben sich nicht. In Abbildung 9 ist das UV-Absorptionsspektrum einer ZEA-Standardlösung dargestellt.

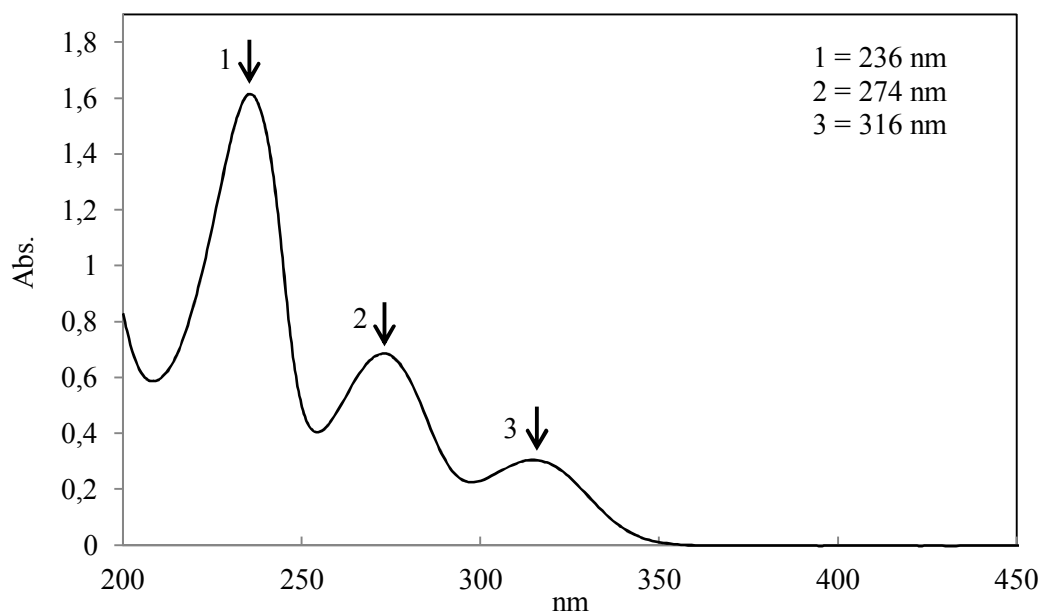


Abbildung 9: Typisches UV-Spektrum einer ZEA-Standardlösung (20 µg ZEA/ml Acetonitril)

4.1.2 Überprüfung des Testsystems für den Nachweis von ZEA

4.1.2.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Die Auswertung der Standardkurven des EIA ergab die in Tabelle 15 zusammengefassten Charakteristika. In Abbildung 10 ist eine typische Standardkurve des Testsystems für ZEA zur Veranschaulichung des Messbereichs abgebildet.

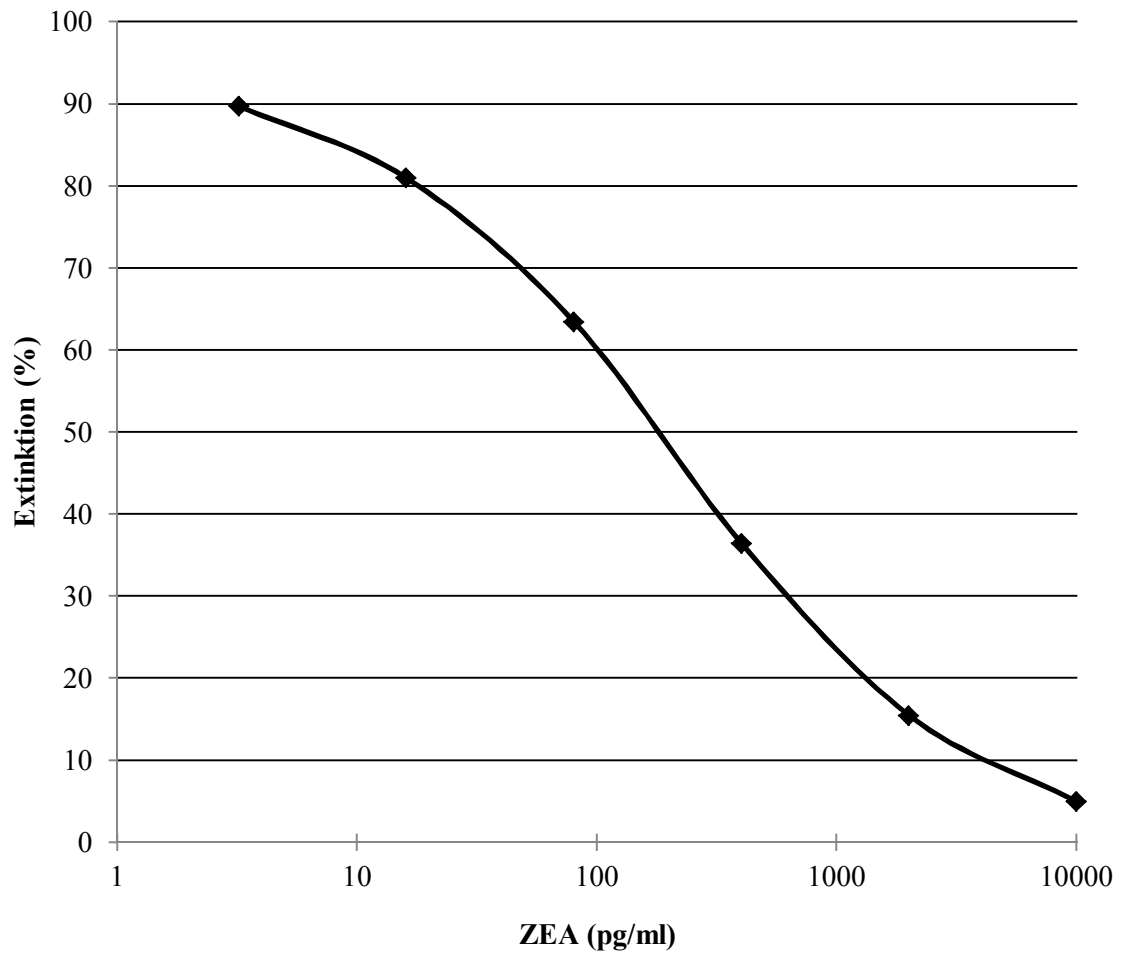


Abbildung 10: Typische Standardkurve des kompetitiven direkten EIA zum Nachweis von ZEA. Die mittlere 50 %-Inhibitionskonzentration der Standardkurve lag bei 388 pg/ml.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 15: Charakteristika der Standardkurven des enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von ZEA nach Auswertung von 91 Tests. Die Nachweisgrenze des Testsystems wurde als die 80 %-Dosis der Standardkurve festgelegt.

	Nachweisgrenze (80 %-Dosis)	50 %-Dosis
Mittelwert, pg/ml	89	388
Standardabweichung, pg/ml	35	100
Variationskoeffizient, %	40	26
Median, pg/ml	82	385
Minimalwert, pg/ml	18	185
Maximalwert, pg/ml	167	585

4.1.3 Probenvorbereitungsverfahren

4.1.3.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen des Enzymimmuntests wurden einige negative Proben aller Produktgruppen künstlich mit einer definierten Toxinmenge kontaminiert und anschließend enzymimmunologisch untersucht. Die rechnerische Nachweisgrenze für ZEA, die anhand der mittleren Nachweisgrenze von 89 pg/ml und unter Berücksichtigung der minimalen Verdünnungsfaktoren berechnet wurde, lag bei 2 ng/g Probe. Die Ergebnisse der Experimente zur Wiederfindung von ZEA in allen untersuchten künstlich kontaminierten Probenmaterialien sind in Tabelle 16 wiedergegeben. Anhand dieser Zusammenstellung wird deutlich, dass die Mittelwerte der Wiederfindung stark ansteigen, je weniger Toxin (in ng/g) zugesetzt wurde, d. h. für Werte im Bereich der Nachweisgrenze.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 16: Wiederfindungsraten für ZEA in verschiedenen Probenmatrizes mittels EIA

Probenart	n	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung	
			Mittelwert (%)	VK (%)
Speiseöle	3	2	207	20
	3	5	167	19
	3	10	119	8
	5	50	112	35
	5	100	90	13
	5	200	80	2
	5	400	64	21
	2	1000	74	15
Sahne	4	1	n. n.	-
	4	2	219	9
	4	5	144	4
	4	10	108	13
	2	20	157	14
	2	50	119	6
	2	100	98	8
Kakaogetränke	5	2	164	20
	5	5	146	26
	4	10	107	11
	2	20	126	2
	2	50	99	0
	2	100	83	8
Schokoladen- desserts	2	1	222	14
	4	2	159	27
	6	5	134	25
	8	10	129	41
	2	50	97	3

VK: Variationskoeffizient; n. n. : nicht nachweisbar (> 80 %-Dosis)

Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse des Enzymimmuntests für ZEA wurde anhand von Mehrfachuntersuchungen überprüft. Diese Mehrfachuntersuchungen natürlich kontaminierter Probenmaterialien zeigen, dass das Untersuchungsverfahren bei einem breiten Spektrum an Probenarten reproduzierbare Ergebnisse liefert (Tabelle 17 und Tabelle 18).

4. ERGEBNISSE

Tabelle 17: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen natürlich mit ZEA kontaminierter Ölproben

Replikant Nr.	Messwert ZEA (ng/g)		
	Maiskeimöl	Walnussöl	Hanföl
1	34,5	7,4	16,9
2	46,8	6,1	13,1
3	38,6	7,7	15,6
4	35,8	6,3	14,7
5	-	-	23,6
Mittelwert (ng/g)	39	7	17
Standardabweichung (ng/g)	5	1	4
Variationskoeffizient (%)	12	10	22

-.: nicht durchgeführt

Tabelle 18: Ergebnisse von Mehrfachuntersuchungen verschiedener natürlich mit ZEA kontaminierter kakaohaltiger Proben

Replikant-Nr.	Messwert ZEA (ng/g)				
	Schoko-Sahne	Kakao-getränk	Kakao-getränk	Schoko-pudding	Schoko-pudding
1	11,9	8,9	6,8	3,5	4,2
2	3,2	5,3	4,9	3,3	5,2
3	6,4	3,8	2,7	2,8	2,1
4	5,1	4,8	4,4	2,9	3,7
5	6	-	-	-	-
6	5,8	-	-	-	-
Mittelwert (ng/g)	6	6	5	3	3,8
Standardabweichung (ng/g)	3	2	1	0,3	1,1
Variationskoeffizient (%)	42	34	31	9	29

-.: nicht durchgeführt

4.1.3.2 Lagerungsfähigkeit der Extrakte

Prinzipiell wurden alle Extrakte frisch hergestellt, um direkt im Anschluss mittels EIA untersucht zu werden. Dennoch war es von Interesse zu wissen, ob sich die ermittelten Toxinkonzentrationen nach Lagerung der Extrakte im EIA verändert darstellen. Dazu wurden fünf natürlich mit ZEA kontaminierte Extrakte von Schokoladendesserts bis zu zwei Wochen gelagert und wöchentlich untersucht. Zusätzlich wurden am Untersuchungstag erneut frische Extrakte derselben Probe hergestellt und ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse dieses Lagerungsversuchs sind in Tabelle 19 ersichtlich. Auffällig ist besonders die Zunahme der ZEA-Konzentration aller Proben der 1. Extraktion in Woche 2 im Vergleich zur ursprünglich ermittelten Konzentration in Woche 1. Als übersichtliche Darstellung sind in Abbildung 11 die ZEA-Gehalte der Proben am letzten Untersuchungstag veranschaulicht.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 19: ZEA-Gehalte in Schokoladendesserts nach Lagerung der Extrakte

Extraktion Nr.	Proben-Nr.	Untersuchungsdatum		
		Tag 1	Tag 7	Tag 14
		ZEA-Gehalte in ng/g (prozentuale Veränderung)		
	3237			
1		6,5 (100 %)	8,2 (126 %)	8,2 (125 %)
2			4,8 (73 %)	8,4 (129 %)
3				6,0 (93 %)
	3238			
1		1,9 (100 %)	3,7 (197 %)	4,9 (258 %)
2			2,4 (126 %)	5,1 (269 %)
3				4,4 (231 %)
	3239			
1		0,4 (100 %)	2,1 (498 %)	2,3 (540 %)
2			1,1 (256 %)	2,7 (621 %)
3				1,6 (379 %)
	3240			
1		0,9 (100 %)	4,3 (493 %)	4,5 (514 %)
2			2,7 (307 %)	5,1 (583 %)
3				3,7 (425 %)
	3241			
1		0,7 (100 %)	3,4 (523 %)	3,2 (486 %)
2			1,1 (163 %)	3,4 (528 %)
3				1,5 (228 %)

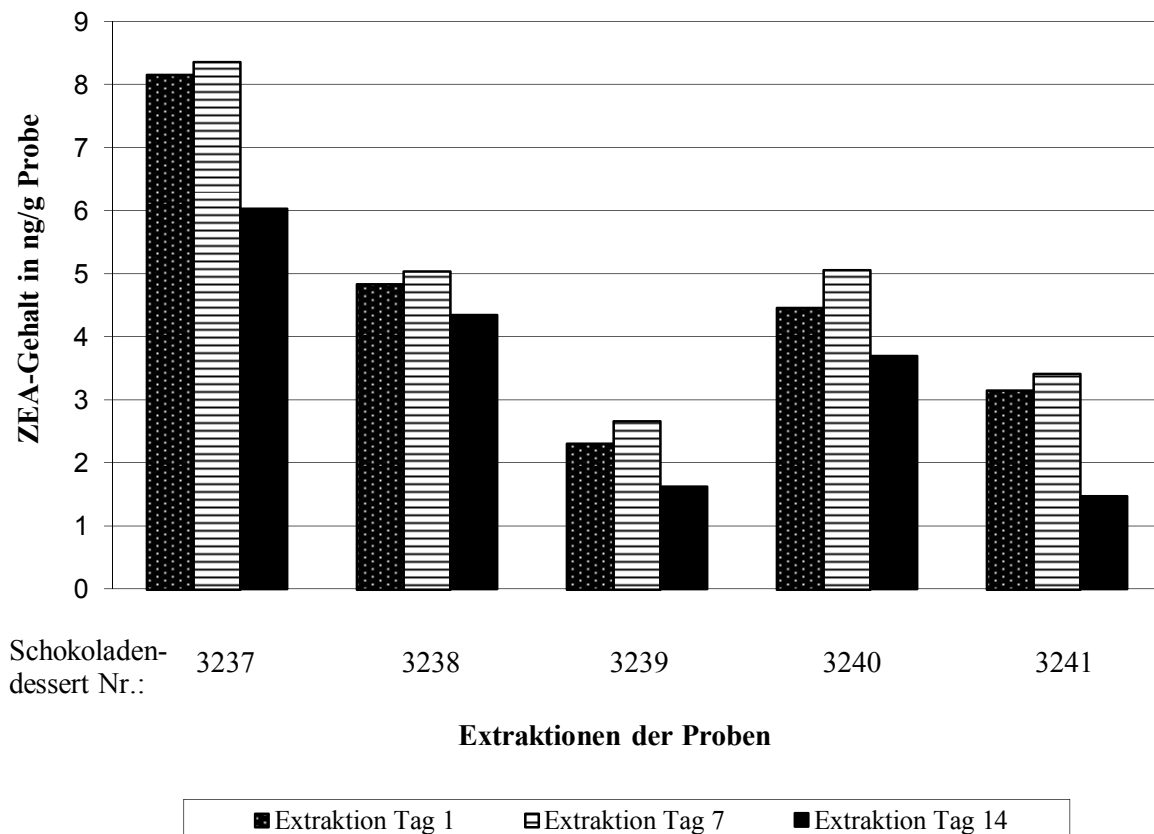


Abbildung 11: Konzentration der im EIA ermittelten ZEA-Gehalte nach Lagerung der Extrakte (letzter Untersuchungstag)

4.1.3.3 Ergebnisse der Probenvorbereitung unter Verwendung von C-18-Kartuschen und Immunaффinitätssäulen

Die Ergebnisse der Experimente zur Wiederfindung von ZEA bei Anwendung von C-18-Kartuschen in künstlich mit ZEA kontaminierten Schokoladendessert-Proben sind in Tabelle 20 wiedergegeben. In Tabelle 21 werden die ermittelten ZEA-Konzentrationen in verschiedenen Proben im Vergleich zur Extraktion ohne C-18-Kartuschen aufgezeigt.

Wie in Kapitel 3.2.2.1.2 beschrieben, wurden bei einigen Proben zusätzlich Immunaффinitätssäulen zur Reinigung der Extrakte angewandt. Zur anschließenden Konzentrationsmessung im EIA wurde jedoch lediglich eine einzelne Schokoladenpudding-Probe auf diese Weise aufgereinigt. Die Änderungen der ZEA-Konzentrationen nach den unterschiedlichen Schritten der Aufreinigung sind in Abbildung 12 dargestellt.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 20: Wiederfindung von ZEA in künstlich kontaminierten Schokoladendessert-Proben nach Aufreinigung mittels C-18-Kartuschen

Proben-Nr.	Toxinzusatz (ng/g)	Wiederfindung (%)
Standard	5	101
	50	72
3138	5	146
	10	196
	50	100
3141	10	121
	10	230
	50	94
3143	5	164
3144	10	110

Tabelle 21: Vergleich der im EIA ermittelten ZEA-Konzentrationen verschiedener Proben (Speiseöle und Schokoladendesserts) bei der Extraktion mit als auch ohne Anwendung von C-18-Kartuschen

Proben-Nr.	C-18-Kartuschen			Extraktion ohne C-18-Kartuschen (ng/g)
	1. Extraktion (ng/g)	2. Extraktion (ng/g)	3. Extraktion (ng/g)	
Schokoladendessert 3061	4,09	-	-	4,68
Walnussöl 2899	5,73	-	-	6,8
Schokoladendessert 3104	6,09	5,76	-	9,82
Maiskeimöl 2895	66,8	48,19	33,04	105,61

-.: nicht durchgeführt

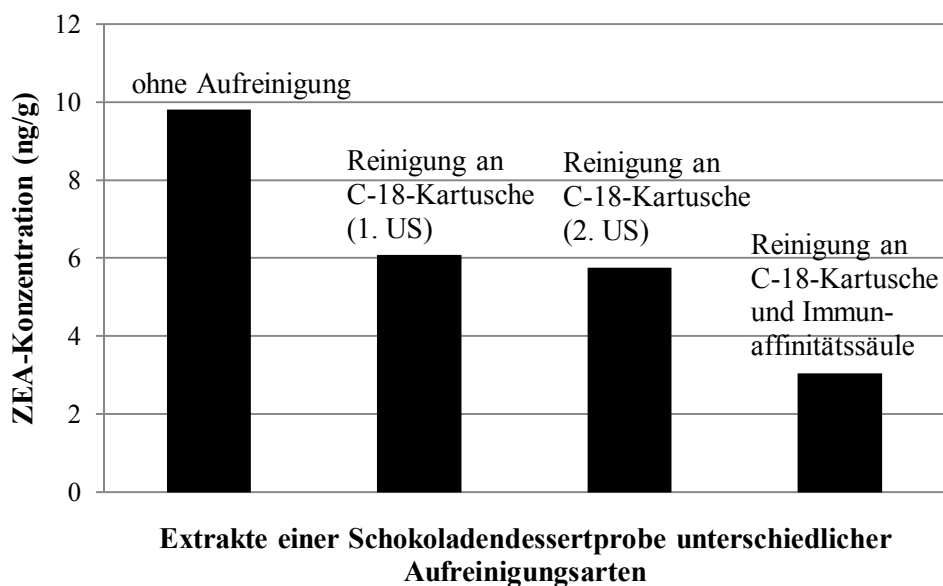


Abbildung 12: Messungen der ZEA-Konzentration einer natürlich kontaminierten Schokoladenpudding-Probe nach Anwendung unterschiedlicher Schritte der Extraktion

4.1.4 Untersuchung mittels HPLC zum Nachweis von ZEA

Zur Überprüfung der Ergebnisse der verwendeten EIA-Methode wurden die Proben mit den höchsten ZEA-Gehalten auch mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD) untersucht. Angewandt wurden dabei zwei verschiedene Methoden (siehe Kapitel 3.2.2.3). Die rechnerische Nachweisgrenze der HPLC-Analyse von ZEA betrug 0,05-0,1 µg/l Extrakt.

4.1.4.1 Ergebnisse der Anwendung von Methode 1 (alkalische Extraktion und IAC)

In den nachfolgenden Abbildungen 13 und 14 sind ein typisches HPLC-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung und ein Chromatogramm eines natürlich mit ZEA kontaminierten kakaohaltigen Milchmischgetränks dargestellt. Die Retentionszeit für ZEA lag bei ~ 6,5 Minuten.

4. ERGEBNISSE

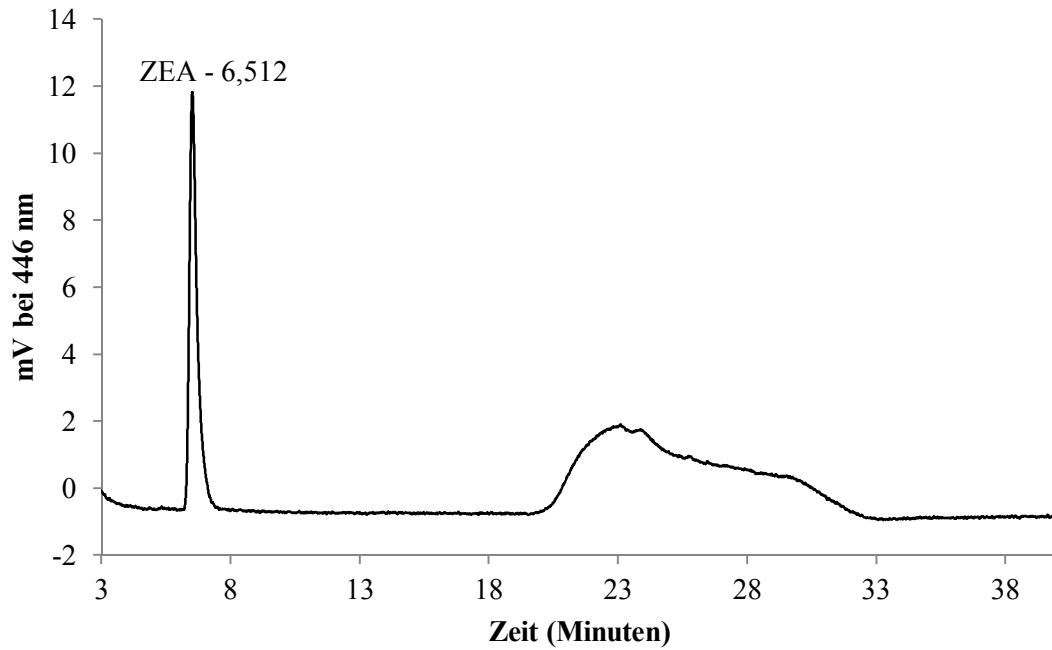


Abbildung 13: Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung mit einer Konzentration von ZEA von 200 ng/ml (Methode 1)

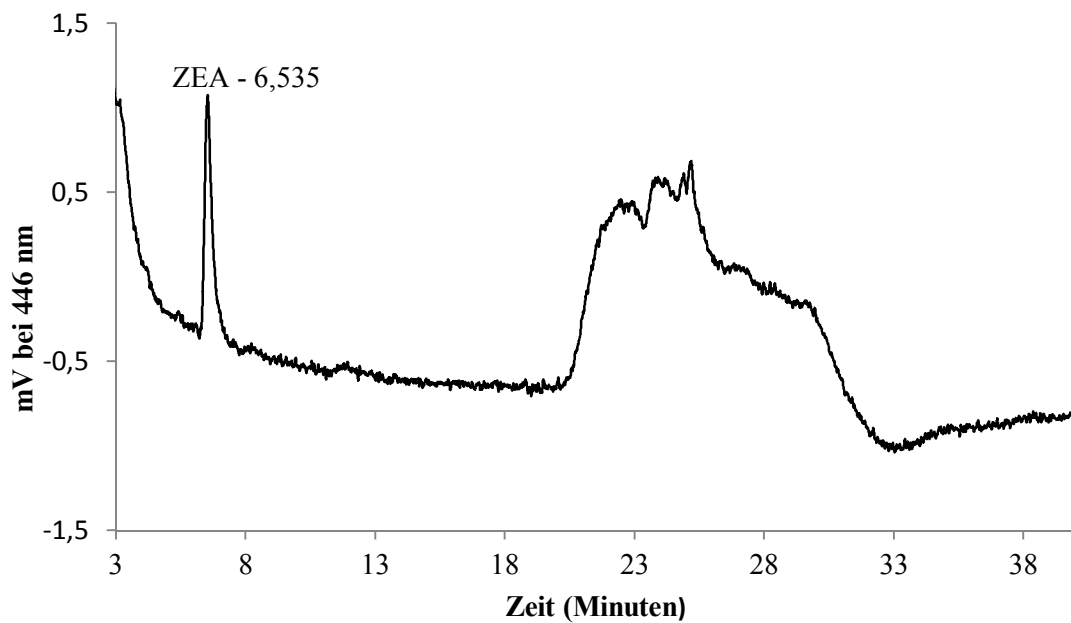


Abbildung 14: Chromatogramm eines natürlich mit ZEA kontaminierten kakaohaltigen Milchmischgetränks (Probe Nr. 2987; Methode 1). Die ermittelte ZEA-Konzentration betrug 1,9 ng/g.

4. ERGEBNISSE

Eine Probe eines ZEA-freien Kakaotranks wurde künstlich mit ZEA versetzt (10 ng/g), um die Wiederfindung dieser HPLC-Methode zu bestimmen. Es wurden 6,5 ng/g Probe detektiert, d. h. die Wiederfindung lag bei 65 %.

Nachfolgend ist anhand Tabelle 22 ein Vergleich der HPLC-Untersuchungen mit den Ergebnissen der EIA-Untersuchungen zusammengestellt.

Tabelle 22: Vergleich der Ergebnisse von EIA und HPLC (Methode 1)

Proben-Nr.	Art der Probe	ZEA-Gehalt in ng/g (EIA)	ZEA-Gehalt in ng/g (HPLC)	Untersuchung des HPLC-Extrakts im EIA (Wiederfindung in % des HPLC-Ergebnisses)
2987	Kakaotrunk	5,72	1,9	113
2975	Kakaotrunk (gespikt mit 10 ng/g ZEA)	-	6,48	91
2895	Maiskeimöl	115,4	44,34	126
2960	Schokoladen-sahne	6,39	0,16	668
2988	Kakaotrunk	4,69	0,54	321
2975	Kakaotrunk	n. n.	0,15	592
2879	Sonnenblumenöl	n. n.	n. n.	-

n. n.: nicht nachweisbar; -: nicht durchgeführt

4.1.4.2 Ergebnisse der Anwendung von Methode 2 (alkalische Extraktion und SPE und IAC)

Zur weiteren Aufreinigung des Probenextrakts wurde, wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben, der Extraktionsvorgang erweitert. Durch die Veränderung der Konzentration des Fließmittels durch einige Vorversuche wurde die Retentionszeit von ZEA verschoben, welche nun bei ~ 12,6 Minuten lag. Außerdem wurde kein Spülschritt zwischen den Injektionen der einzelnen Proben ausgeführt. Stattdessen wurde eine Injektionspause eingefügt, wodurch sich der Gradient wieder auf Acetonitril/A. dest. (40:60; v/v)

4. ERGEBNISSE

einpendeln konnte und es somit zu keiner unregelmäßigen Verschiebung der Retentionszeit kam. In Abbildung 15 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung dieser Methode dargestellt. Anhand Abbildung 16 wird deutlich, dass die Proben im Vergleich zu Methode 1 weiter aufgereinigt sind, denn es sind weniger Interferenzen im Chromatogramm ersichtlich. Die hierauf abgebildete Probe ist dasselbe kakaohaltige Milchmodstrränk, das in Abbildung 14 (Methode 1) dargestellt ist und somit mittels beider Methoden untersucht wurde.

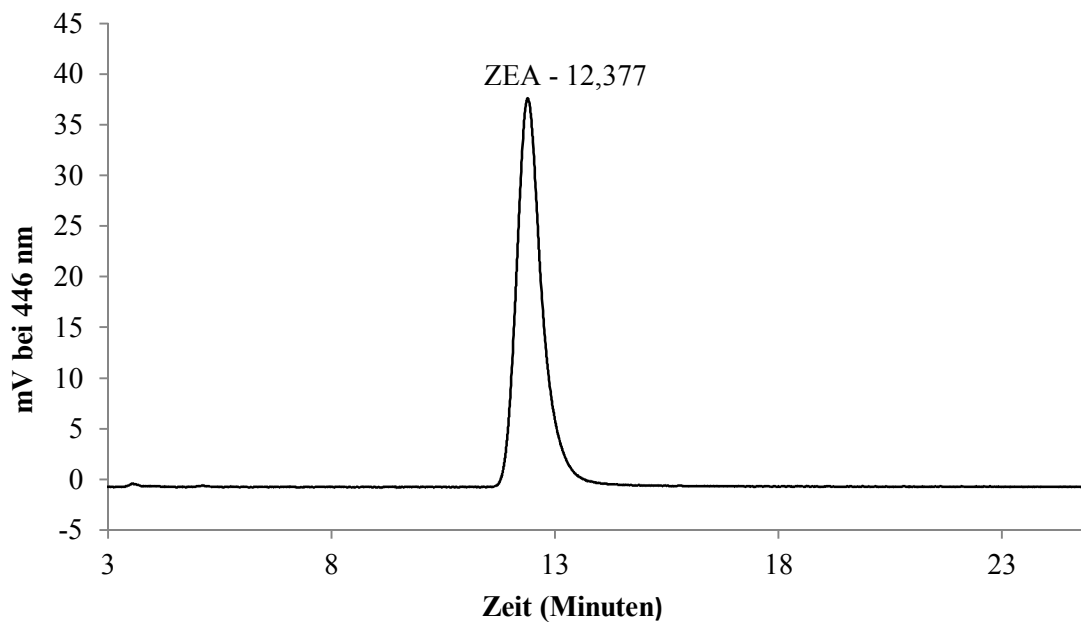


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm einer ZEA-Standardlösung mit einer Konzentration von ZEA von 10 µg/ml (Methode 2)

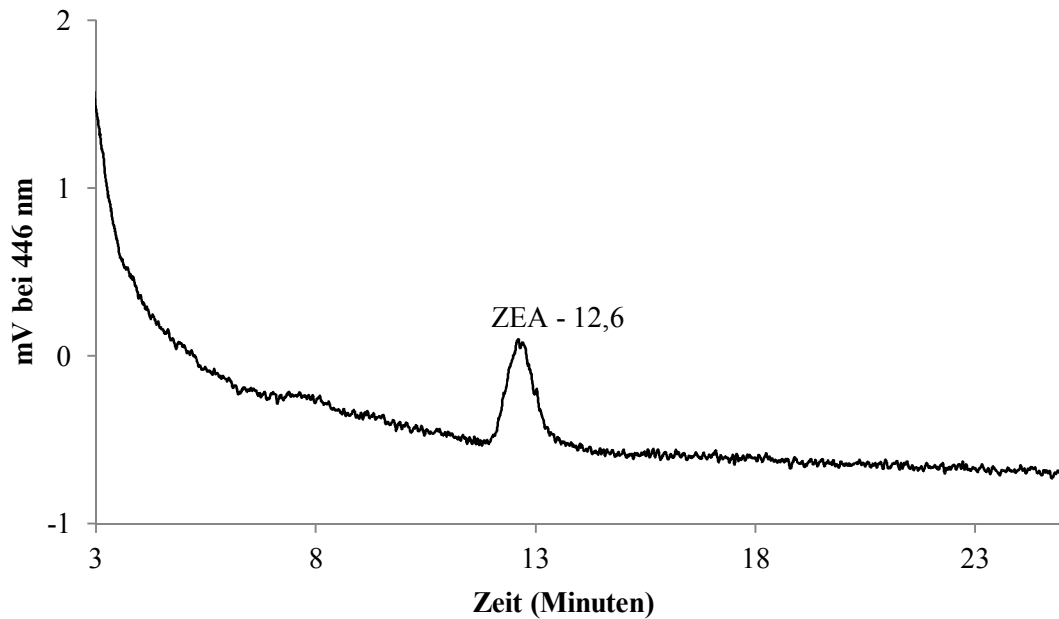


Abbildung 16: Chromatogramm eines natürlich mit ZEA kontaminierten kakaohaltigen Milchmischgetränks (Probe Nr. 2987; Methode 2). Die hier ermittelte ZEA-Konzentration betrug 2,3 ng/g.

Eine Probe einer ZEA-freien Schokoladendessertcreme wurde künstlich mit ZEA versetzt (50 ng/g), um die Wiederfindung dieser HPLC-Methode zu bestimmen. Es wurden 31,74 ng/g Probe detektiert, d. h. die Wiederfindung lag bei 63,5 %.

Nachfolgend ist anhand Tabelle 23 ein Vergleich der HPLC-Untersuchungen dieser Methode mit den Ergebnissen der vorhergehenden EIA-Untersuchungen zusammengestellt. Es wird deutlich, dass die ermittelten ZEA-Konzentrationen der HPLC deutlich niedriger sind, als diejenigen, die im EIA detektiert wurden.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse von EIA und HPLC (Methode 2)

Proben-Nr.	Art der Probe	ZEA-Gehalt (EIA) in ng/g	ZEA-Gehalt (HPLC) in ng/g (WF in % im Vergleich zum EIA)
3104	Schokoladenmousse	9,82	1,15 (11,7)
3061	Stracciatella-Creme	4,68	0,68 (14,5)
3088	Schokoladenpudding	6,9	0,25 (3,6)
3108	Schokoladendessertcreme	n. n.	n. n. (-)
2987	Kakaogetränk	5,72	2,3 (40,2)
2988	Kakaogetränk	4,69	0,4 (8,5)
2960	Schokoladensahne	6,39	0,93 (14,6)
2895	Maiskeimöl	115,4	26,58 (23)

n. n.: nicht nachweisbar; *WF*: Wiederfindung

4.1.4.3 HPLC-Fraktionierung

Um die Ergebnisse der HPLC und die des Enzymimmuntests zu überprüfen, wurde eine HPLC-Fraktionierung durchgeführt, d. h. die ZEA-reiche Eluat-Fraktion eines Probenextrakts aus der HPLC-Analyse wurde aufgefangen und anschließend im EIA untersucht. Eine Schokoladenmousse-Probe wurde zweimal extrahiert und der Extrakt, wie in Kapitel 3.2.2.3.1 beschrieben, in die HPLC eingesetzt. Die ZEA-Konzentration dieser Probe wurde in der HPLC mit 0,8 ng/g Probe bzw. mit 0,68 ng/g ermittelt. Beide ZEA-reichen Fraktionen wurden zusammengeführt, abgedampft und anschließend in 500 µl Methanol/PBS (10:90; v/v) gelöst. Durch diese erneute Lösung erhielt man eine errechnete Konzentration von 2,8 ng/ml. Die anschließende Messung dieser Fraktionen im EIA ergab eine Konzentration von 3,2 ng/ml und somit eine Wiederfindungsrate von 114,3 % im EIA.

4.2 Untersuchung der Probenmaterialien auf ZEA mittels EIA und HPLC

4.2.1 Speiseöle

Die starke Lipophilie von ZEA ist der Grund, warum dieses Mykotoxin während des Ölherstellungsprozesses in die Ölfraction übergehen bzw. sogar dort angereichert werden kann. Im EIA wurden alle untersuchten Maiskeimöle ($n = 7$) positiv auf ZEA getestet (31-

4. ERGEBNISSE

106 ng/g). Keines überstieg jedoch die derzeit in der EU gültige erlaubte Höchstmenge von 400 µg/kg (Änderungsverordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission bezüglich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen vom 28. September 2007). ZEA wurde ebenso in mehreren anderen Speiseölen detektiert; die Toxinkonzentration war hierbei aber deutlich niedriger (2-47 ng/g). Eine Übersicht über die untersuchten Probenarten und ihre ermittelten ZEA-Konzentrationen ist in Tabelle 24 gegeben.

Tabelle 24: Vorkommenshäufigkeit von ZEA und ZEA-Konzentrationen in verschiedenen Speiseölprodukten

Ölquelle	n	n pos	MW (ng/g)	Standard-abweichung	Min (ng/g)	Max (ng/g)
Maiskeimöl	7	7	55,9	24,4	31,2	105,6
Walnussöl	5	5	10,3	6,5	4,5	21,3
Erdnussöl	2	2	4,3	1,2	3,4	5,1
Distelöl	2	1	1,7	1	1*	2,4
Olivenöl	2	2	5,1	3,6	2,5	7,6
Sesamöl	2	2	26,9	28,5	6,7	47
Kürbiskernöl	1	1	26,1	-	-	-
Hanföl	1	1	16,8	-	-	-
Weizenkeimöl	1	1	10,4	-	-	-
Leinsamenöl	1	1	8,5	-	-	-
Mandelöl	1	0	-	-	-	-
Traubenkernöl	1	0	-	-	-	-
Rapsöl	1	0	-	-	-	-
Sojaöl	1	0	-	-	-	-
Sonnenblumenöl	1	0	-	-	-	-
Trüffelöl	1	0	-	-	-	-
„Klassik-Pflanzenöl“	1	0	-	-	-	-

* wurde aus statistischen Gründen mit der halben Nachweisgrenze gewertet (1 ng/g); *pos*: positiv; *MW*: Mittelwert; *Min*: Minimalwert; *Max*: Maximalwert

4. ERGEBNISSE

In nachfolgender Abbildung 17 sind alle auf ZEA positiv getesteten Proben ihrer Konzentration nach gelistet. Generell liegen diese Ergebnisse in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die Ergebnisse früherer Studien über ZEA in Speiseölen (KAPPENSTEIN et al., 2005b; MAJERUS et al., 2009).

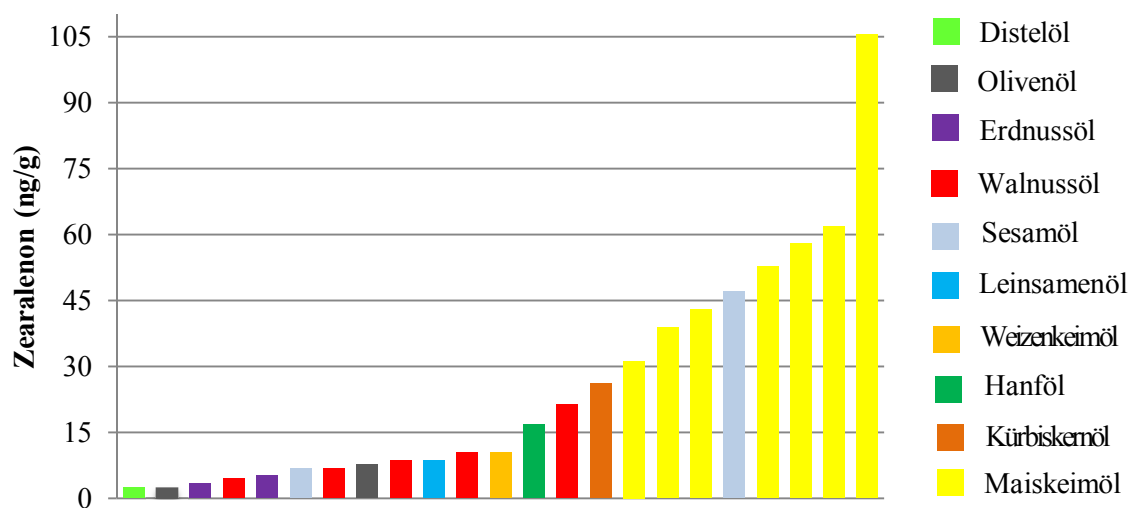


Abbildung 17: Saat-abhängige ZEA-Konzentration in Speiseölen (ZEA-Gehalt aufsteigend sortiert)

In der HPLC wurde ausschließlich die am höchsten kontaminierte Maiskeimölprobe untersucht. Die dort ermittelten ZEA-Konzentrationen betrugen 44,34 ng/g Probe bzw. 41,57 ng/g Probe (Methode 1). Mittels Methode 2 der HPLC-Analyse wurde in derselben Probe ein Gehalt des Toxins von 26,58 ng/g festgestellt.

4.2.2 Sahne

Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass für ZEA ein minimales carry-over in Milch möglich ist (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992). Hierzu wurde jedoch aus analytischen Gründen stets die Magermilchfraktion untersucht. Da ZEA jedoch sehr lipophil ist, sollte in der vorliegenden Dissertationsarbeit der Frage nachgegangen werden, ob eine bisher unbeachtete Anreicherung von ZEA in fettreichen Milcherzeugnissen vorliegen könnte. Untersucht

4. ERGEBNISSE

wurden dazu handelsübliche Schlagsahneerzeugnisse ($n = 40$). Diese wurden sowohl im flüssigen Zustand, aufgeschlagen oder teilweise auch als Rahmfraction analysiert, was aber keine Beeinträchtigung der Ergebnisse nach sich zog. Während reine Schlagsahne ausnahmslos ZEA-negativ war, wurde in zwei Proben **sprühfertiger Schokoladensahne** ZEA in Gehalten deutlich oberhalb der Nachweisgrenze detektiert (5 ng/g bzw. 6,4 ng/g). In Abbildung 18 sind die ZEA-Konzentrationen einer Schokoladensahne aus mehrfach durchgeführten EIA-Untersuchungen ersichtlich, welche eine durchschnittliche Konzentration von 6,4 ng/g dieser Probe ergaben.

Diese Schokoladensahne wurde ebenso mittels HPLC untersucht. Die detektierten ZEA-Konzentrationen betrugen hier 0,16 ng/g Probe (Methode 1) bzw. 0,93 ng/g Probe (Methode 2).

Die ZEA-negativen Befunde in reiner Sahne deuteten auf einen Eintrag von ZEA über den Kakao hin. Daher wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen im Weiteren auf kakaohaltige Lebensmittel gelegt (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

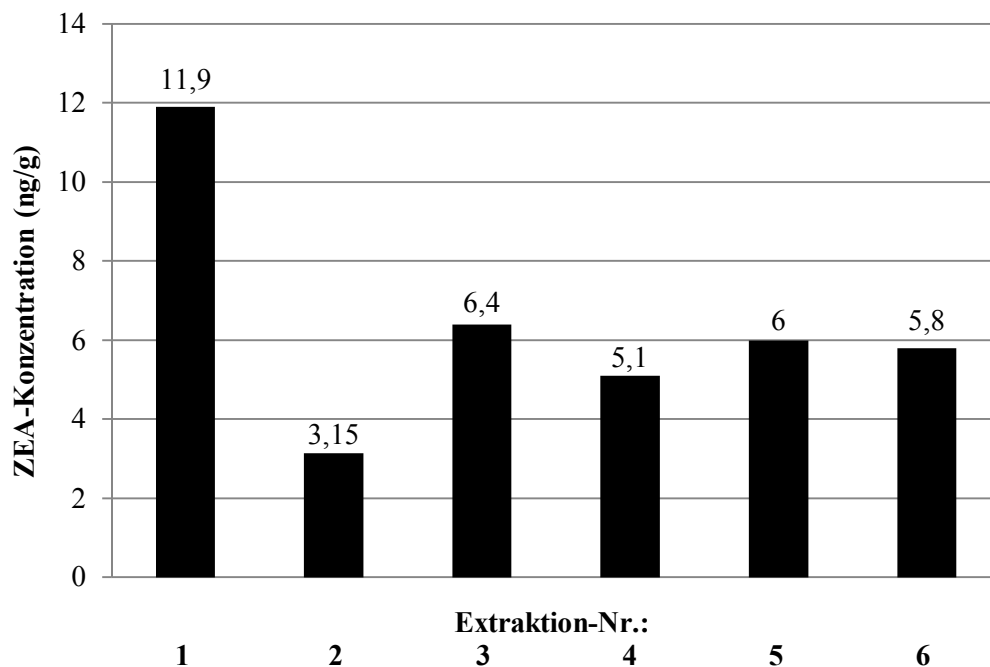


Abbildung 18: Mittels EIA detektierte ZEA-Konzentrationen in Schokoladensahne-Probe Nr. 2960 (sechs verschiedene Extraktionen)

4.2.3 Kakaohaltige Milchmischgetränke

Mittels EIA wurden kakaohaltige Milchmischgetränke aus dem Lebensmitteleinzelhandel (n = 28) untersucht, wobei 25 % (n = 7) ein positives Ergebnis für ZEA ergaben. In Abbildung 19 sind die mittels EIA ermittelten ZEA-Konzentrationen dieser Proben graphisch dargestellt. Drei (bzw. zwei) der Proben wurden weiter mittels Methode 1 (Methode 2) einer HPLC-Untersuchung unterzogen. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse vergleichend aufgeführt. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass zwei der mit ZEA kontaminierten Proben einen vergleichsweise hohen Kakaogehalt aufwiesen (14 % Schweizer Schokolade (entsprechend Proben-Nr. 5 in Abbildung 19) bzw. 2,2 % fettarmes Kakaopulver aus Arriba Edelkakao (entsprechend Proben-Nr. 6 in Abbildung 19)).

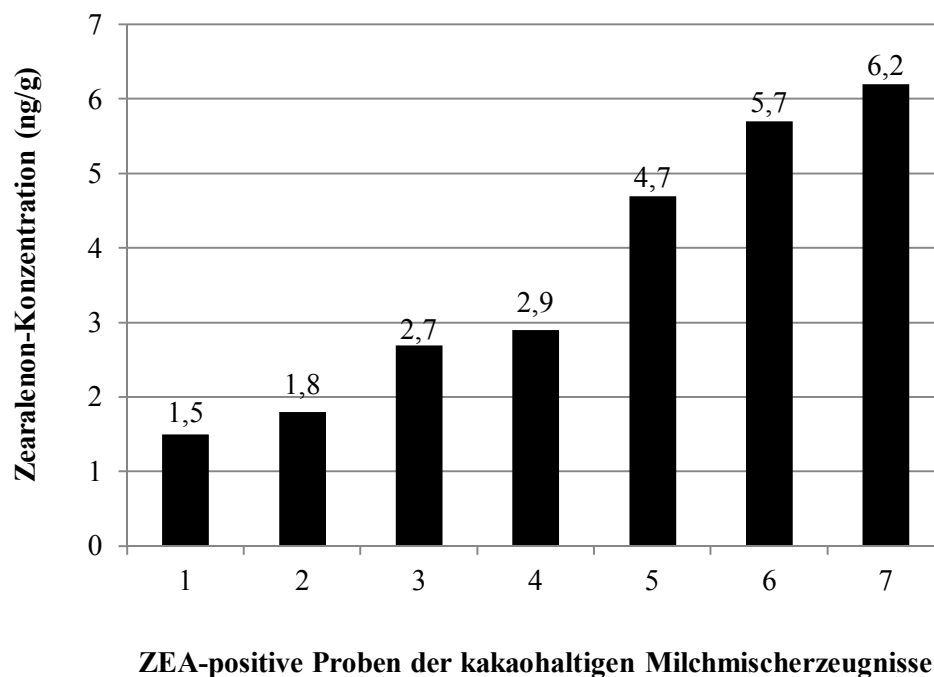


Abbildung 19: Mittels EIA ermittelte ZEA-Konzentrationen von kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen

4. ERGEBNISSE

Mittels HPLC-Untersuchungen konnte in zwei Proben die Anwesenheit von ZEA qualitativ bestätigt werden, allerdings mit deutlich niedrigeren Gehalten (Tabelle 25).

Tabelle 25: Vergleich der im EIA und in der HPLC gemessenen ZEA-Konzentrationen verschiedener kakaohaltiger Milchmischgetränke

Proben-Nr.	Ermittelte ZEA-Konzentration (in ng/g)		
	HPLC-Methode 1	HPLC-Methode 2	EIA
2975	0,15	-	n. n.
2987	1,9	2,3	5,72
2988	0,54	0,4	4,69

n.n.: nicht nachweisbar; -: nicht durchgeführt

4.2.4 Schokoladendesserts

Enzymimmunologisch wurden 63 verschiedenartige Schokoladendesserts untersucht, wovon in rund der Hälfte (52 %) ZEA nachgewiesen werden konnte. Die ermittelten Toxingehalte lagen in einem Bereich von 1,1 ng/g – 9,8 ng/g bei einem durchschnittlichen ZEA-Gehalt von $3,4 \pm 2$ ng/g. In Tabelle 26 ist eine Untergliederung der Schokoladendesserts in die einzelnen Untergruppen sowie die jeweils enthaltene ZEA-Menge zusammengestellt.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 26: Im EIA ermittelte ZEA-Konzentrationen der verschiedenen Schokoladendesserts

Probenart	n	n pos (%)	Zearalenon-Gehalt (ng/g)		
			Bereich	Mittelwert*	Standardabw.
Schokoladenpudding	33	6 (18)	2,2 – 6,9	3,4	1,6
Quark-Joghurt-Creme Stracciatella	13	11 (85)	1,1 – 8,3	3,3	2,0
Mousse au chocolat	8	8 (100)	1,2 – 9,8	4,7	2,7
Schoko-Joghurt	4	3 (75)	1,6 – 3,4	2,7	0,8
Grießdessert Schoko	3	3 (100)	1,3 – 3,6	2,3	1,0
Milchreis Schoko	2	2 (100)	1,2 – 5,5	3,4	2,2
Alle Schokodesserts	63	33 (52)	1,1 – 9,8	3,4	2,0

*nur positive Proben

Vier verschiedene Proben von Schokoladendesserts wurden ebenso mittels HPLC (Methode 2) untersucht. Die dabei gemessenen ZEA-Konzentrationen sowie die zuvor im EIA ermittelten Konzentrationen der Proben sind in Tabelle 27 aufgeführt. Die ZEA-Kontamination konnte in drei Proben qualitativ bestätigt werden, allerdings bei quantitativ deutlich niedrigeren Messwerten.

Um genauere Ergebnisse über die Vorkommenshäufigkeit von ZEA in Schokoladendesserts zu erhalten wurde zusätzlich von einigen Proben eine zweite Charge derselben Produkte untersucht. Der im EIA gemessene ZEA-Gehalt beider Chargen ist in Tabelle 28 ersichtlich.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 27: Vergleich der im EIA und in der HPLC gemessenen ZEA-Konzentrationen verschiedener Schokoladendessertproben

Proben-Nr.	Ermittelte ZEA-Konzentration (in ng/g)	
	HPLC-Methode 2	EIA
3061	0,68	4,68
3088	0,25	6,9
3104	1,15	9,82
3108	n. n.	n. n.

n. n. : nicht nachweisbar ($< 0,1$ ng/g)

Tabelle 28: Mittels EIA analysierte ZEA-Gehalte ausgewählter Erzeugnisse von Schokoladendesserts, Untersuchung von jeweils zwei unterschiedlichen Chargen jedes Erzeugnisses

Probennummern	ZEA-Gehalt (ng/g)	
	1. Charge	2. Charge
3057, 3233	3,1	3,12
3061, 3234	4,68	2,19
3088, 3235	6,9	2,51
3089, 3236	4	2,07
3104, 3237	9,82	6,34
3103, 3238	3,8	3,47
3099, 3239	3,22	1,62
3102, 3240	3,9	3,55
3091, 3241	3,61	1,98

4.3 Weiterführende Untersuchungen mittels LC-MS/MS

Zur Absicherung der Befunde der eigenen Untersuchungen wurden drei verschiedene Proben (Schokoladendesserts), welche im EIA positiv auf ZEA getestet wurden, in das Nationale Referenzlabor für Mykotoxine (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR; Dr. Horst Klaffke) in Berlin geschickt und dort mittels LC-MS/MS untersucht. Die ermittelten Ergebnisse wurden der Professur für Milchwissenschaften mitgeteilt. Auffällig war dabei, dass eine der Proben in der LC-MS/MS negativ auf ZEA getestet wurde, eine weitere Probe enthielt ZEA und in der dritten Probe konnte Zearalanon anstatt ZEA nachgewiesen werden. Die jeweiligen Mykotoxinkonzentrationen sind Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 29: Mittels EIA und LC-MS/MS detektierte ZEA- und Zearalanon-Gehalte in verschiedenen Schokoladendessertproben

Proben-Nr.	ZEA-Gehalt im EIA		Toxinkonzentration in der LC-MS/MS (API 4000)	
	in ng/g Probe	in ng/ml Extrakt	ZEA in ng/ml Extrakt	Zearalanon in ng/ml Extrakt
3237	6,34	1,51	n. n.	n. n.
3238	3,47	1,09	n. n.	0,242
3240	3,55	0,93	1,58	n. n.

API: Atmospheric Pressure Ionisation; *n. n.:* nicht nachweisbar

4.4 Laborvergleichsstudie

Die Auswertung der Laborvergleichsstudie „ZEA in Speiseölen“ erfolgte vom Organisator (BAM) mit Hilfe des Software-Programms für Methodenringversuche und Laborvergleichsuntersuchungen ProLab Plus (Version 2.12.0.0) der *quo data* GmbH, Dresden. Da der Ringversuch dem vorrangigen Ziel eines Erkenntnisgewinns und weniger einer strikten Methodenvergleichsstudie galt, wurde sowohl die Auswertung nach ISO 5725-2 (bzw. ASU § 64 LFGB) als auch die robuste Auswertung nach DIN 38402 A45 herangezogen.

In nachfolgender Tabelle 30 sind die ermittelten ZEA-Konzentrationen aller Laboratorien (inklusive der eigens ermittelten) für die drei Proben A, B und C sowie für die Testlösung zusammengestellt.

Die dort ersichtliche Anzahl an 15 Teilnehmern erklärt sich dadurch, dass ein Laboratorium insgesamt sechs verschiedene Analysemethoden einreichte.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 30: Von allen an der Laborvergleichsstudie teilnehmenden Laboratorien ermittelte ZEA-Konzentrationen aller Proben sowie der Testlösung

Statistische Kenngröße	A	B	C	Testlösung (ng/ml)
<u>Auswertung nach ISO 5725</u>				
Mittelwert (µg/kg)	74,2	62,8	623	
Rel. Wiederhol-STD (%)	11,5	7,7	5,4	
Rel. Vergleichs-STD (%)	18,3	31,2	12,9	
Rel. Horwitz-STD (%)	23,7	24,3	17,2	
HORRAT	0,77	1,29	0,75	
Anzahl Teilnehmer	15	13*	14	
Ausreißer	0	1	1	
Eigenes Ergebnis (EIA)	Durchschnittlicher ZEA-Gehalt (µg/kg)			Testlösung (ng/ml)
	A	B	C	
	94,17	112,27	562,1	94,6
<u>Auswertung nach DIN 38402 A45</u>				
Mittelwert (µg/kg)	74	61,7	627	
Rel. Wiederhol-STD (%)	10,3	7,8	3,6	
Rel. Vergleichs-STD (%)	14,9	31,0	13,8	
Rel. Horwitz-STD (%)	23,7	24,3	17,2	
HORRAT	0,63	1,27	0,81	
Anzahl Teilnehmer	15	14*	15	
Ausreißer	0	0	0	
Gesamtmittelwert (µg/kg)	74,1	62,25	625	98

* Ein Laboratorium gab für Probe B keine quantitativen Ergebnisse an, da diese unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Dieses Labor wurde daher nicht in die Auswertung bei Probe B einbezogen.

4. ERGEBNISSE

Anhand der Ergebnisse in Tabelle 30 lässt sich festhalten, dass für alle drei Öle vergleichbare Resultate hinsichtlich der Mittelwerte und der Standardabweichungen nach beiden Auswerteverfahren (ISO 5725 und DIN 38402 A45) erhalten wurden.

Während bei den Proben A und B aufgrund ihres natürlichen (unbekannten) ZEA-Gehaltes eine Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich systematischer Fehler (Richtigkeit) schwer fällt, ist diese Beurteilung bei Probe C recht gut möglich. Der durch Dotierung eingestellte ZEA-Gehalt von 630 µg/kg wurde im Ringversuch mit einem Gesamtmittelwert von etwa 625 µg/kg ermittelt, was einer Wiederfindung von etwa 99 % entspricht.

Die Testlösung wurde einer kurzzeitigen UV-Bestrahlung bei 350 nm ausgesetzt, was zu einer Isomerisierung von 5-10 % des ZEA-Standards (trans-ZEA) in das entsprechende cis-ZEA Isomer zur Folge hatte (genaue Quantifizierung war aufgrund eines fehlenden cis-ZEA Standards nicht möglich). Aufgrund einer Doppelbindung im Lactonring ($C_{11}=C_{12}$) kann ZEA in zwei isomeren Formen (cis/trans) vorliegen, wobei das trans-ZEA in der Natur dominiert. Durch Lichteinstrahlung wird die Bildung von cis-ZEA induziert, sodass bei ZEA-kontaminierten Proben prinzipiell von beiden isomeren Formen auszugehen ist. Da cis-ZEA bei den gängigen Probenaufarbeitungsmethoden (auch bei Immunaффinitätssäulen) miterfasst wird, ist dessen chromatographische Abtrennung von trans-ZEA maßgeblich von der verwendeten HPLC-Methode abhängig. Ziel der geringfügigen cis/trans-ZEA Isomerisierung der Testlösung war es daher, eventuell ein Feedback der Ringversuchsteilnehmer bezüglich eines zweiten Peaks in der HPLC mit gleichen Detektionseigenschaften (Massenübergänge bzw. Fluoreszenz) zu erhalten, ohne die ursprüngliche Intention eines Kontrollstandards in Frage zu stellen. Zwei Teilnehmer, welche HPLC-FLD als Messverfahren anwandten, berichteten über einen unüblichen Zusatzpeak, welcher nicht mitintegriert wurde. Die mittels HPLC-MS/MS gemessene Testlösung zeigt hingegen keine Anzeichen eines zweiten Peaks. Die Abweichung zwischen dem Sollwert (117 ng/ml) und dem Labor-Gesamtmittelwert (98 ng/ml) ist deutlich höher als die Soll/Ist-Abweichung bei der dotierten Ölprobe C, obwohl es sich um einen reinen Messstandard handelte. Dieses Ergebnis dürfte im Wesentlichen auf die unterschiedliche (Mit)erfassung von cis-ZEA zurückzuführen sein.

Die Professur für Milchwissenschaften der JLU ermittelte für Probe A einen durchschnittlichen ZEA-Gehalt von 94,17 µg/kg, für Probe B einen Gehalt von 112,27 µg/kg und für Probe C einen Gehalt von 562,1 µg/kg. In der Testlösung wurde eine

4. ERGEBNISSE

ZEA-Konzentration von 94,6 ng/ml detektiert. Die angegebenen Werte sind um die ermittelte Wiederfindung von 95 % korrigiert dargestellt.

4.4.1 Überprüfung der Testrobustheit des enzymimmunologischen Nachweises von ZEA in Speiseölen anhand der Laborvergleichsstudie der BAM

In einigen Vorversuchen zur Laborvergleichsstudie wurde die Testrobustheit des angewandten Enzymimmuntests untersucht. Dazu wurden die drei vorgegebenen Proben und die Testlösung jeweils mehrfach untersucht und das sowohl mit als auch ohne C-18-Kartuschen mit Anwendung von zwei verschiedenen eigenen Toxinstandardlösungen. In Tabelle 31 und in Abbildung 20 sind die jeweils gemessenen ZEA-Konzentrationen ersichtlich.

Tabelle 31: ZEA-Gehalte der von der BAM erhaltenen Proben, gemessen mittels EIA unter unterschiedlichen Extraktionsbedingungen

Probe	ZEA-Konzentration (ng/g)								
	Toxinstandardlösung 1						Toxinstandardlösung 2		
	ohne C-18-Kartusche		mit C-18-Kartusche				mit C-18-Kartusche		
A	50,6	64,1	63	59,1	55		92,4	99,9	76
B	68	77,2	57,2	62,4	58,3		107,9	110,8	100,8
C	516	-	326,5	339,6	296,8		488,8	624,6	488,4
Testlösung	-	-	-	61,8	56,8		91,9	105,3	86,6

-.: nicht durchgeführt

4. ERGEBNISSE

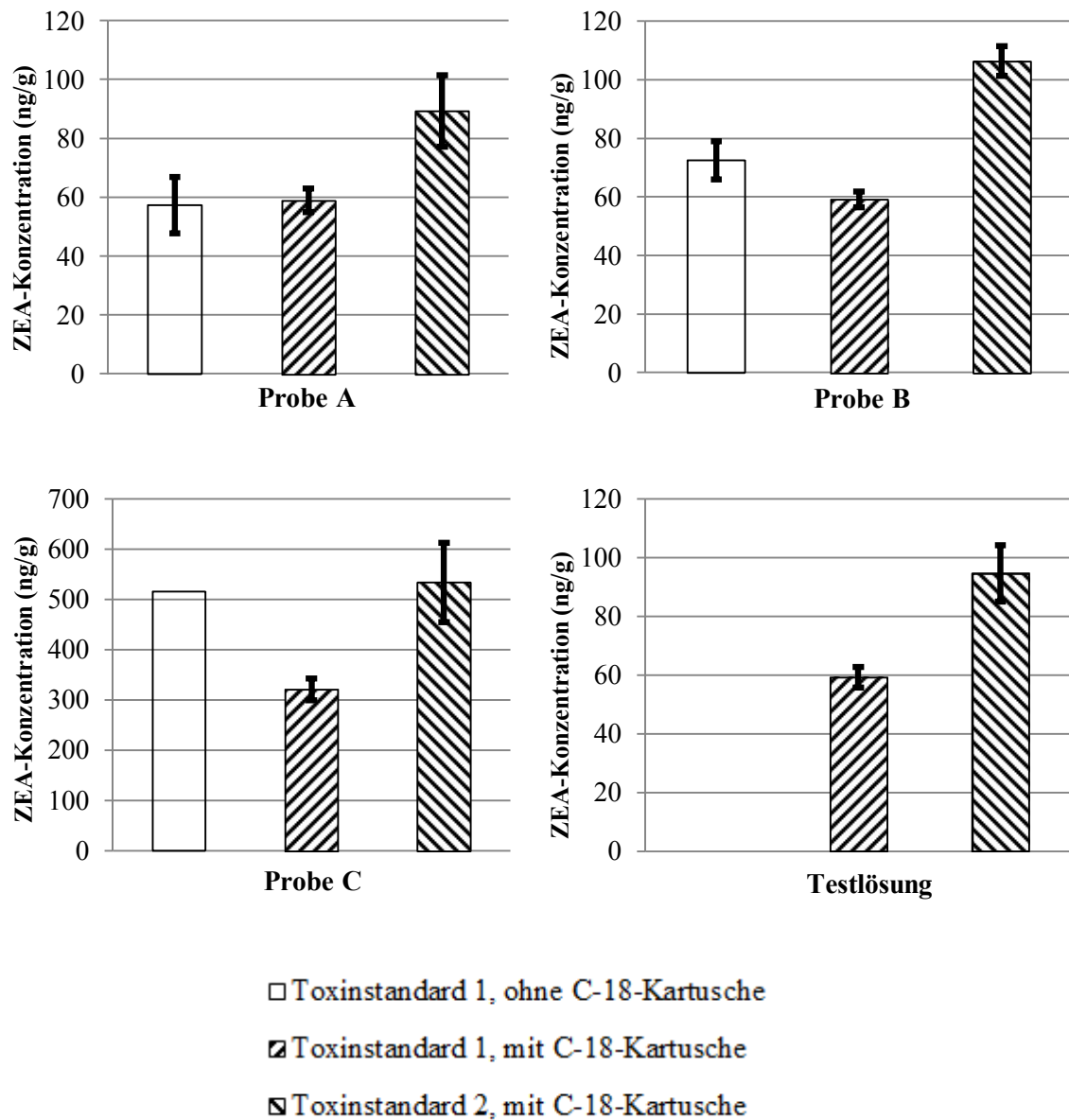


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen ZEA-Konzentrationen aller von der BAM erhaltenen Proben inklusive Standardabweichungen

5 DISKUSSION

Da ZEA eine sehr stabile Verbindung ist, die durch Lagerung, Mahlen, diversen Produktionsschritten und Kochen kaum zerstört werden kann, besteht seit längerer Zeit ein großes wissenschaftliches Interesse am Vorkommen dieses östrogenartig wirkenden Mykotoxins in verschiedenen Lebensmitteln. Durch seine starken lipophilen Eigenschaften kann es während der Produktion von Pflanzenölen in diese übergehen bzw. sogar in den Ölen angereichert werden. In dieser Arbeit sollte zum einen der Frage nachgegangen werden, inwieweit handelsübliche Speiseöle mit ZEA kontaminiert sind. Zum anderen wurde untersucht, ob ZEA auch in Sahne angereichert wird, da diese ebenfalls einen hohen Fettanteil besitzt und bisherige Untersuchungen gezeigt hatten, dass ein carry over von ZEA in Milch möglich ist (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992). Durch einen Zufallsbefund in kakaohaltiger Sprühsahne wurde der weitere Fokus dieser Arbeit auf das Vorkommen von ZEA in kakaohaltigen Milcherzeugnissen gelenkt.

Aus der Sicht des gesundheitlichen Verbraucherschutzes ist die Einhaltung von Regelungen bezüglich Rückständen und Kontaminanten für alle Lebensmittel gleichermaßen zu fordern. Allerdings stehen bei der Überwachung dieser Regelungen diejenigen Lebensmittel deutlich im Vordergrund, die aufgrund hoher täglicher Verzehrsmengen und aufgrund einer breiten Konsumentenschicht innerhalb der Bevölkerung als Grundnahrungsmittel für das öffentliche Gesundheitswesen von besonderer Wichtigkeit sind. Hierzu gehören beispielsweise die Speiseöle und Sahne. Weiterhin ist für die Einbeziehung eines Lebensmittels in die Routineuntersuchung auf einen bestimmten Schadstoff zumindest ein begründeter Hinweis auf eine mögliche Belastung erforderlich. Bisher gab es in der wissenschaftlichen Literatur keinen Hinweis darauf, dass Kakao mit ZEA belastet sein könnte. In einem Poster berichten SCHOLTEN et al. (2010) zwar ebenfalls über ZEA-Befunde in Kakao, allerdings fehlen in diesem Beitrag alle wesentlichen Detailangaben. In dieser Arbeit wurde dieser Fragestellung erstmals systematisch nachgegangen.

Da für die Untersuchung zum möglichen Vorkommen von ZEA in Sahne und Kakaoprodukten keine erprobten Analyseverfahren zur Verfügung standen, musste hierzu jeweils eine Optimierung und Validierung der erarbeiteten Verfahren vorangestellt werden.

5. DISKUSSION

Für alle untersuchten Produktgruppen wurde zunächst ein schon etabliertes EIA-Untersuchungsverfahren eingesetzt (SEIDLER, 2007), welches für den ZEA-Nachweis in getreidehaltigen Lebensmitteln und Konsummilch entwickelt worden war.

EIA-Methoden sind für ein schnelles Screening und zur Bestimmung von Mykotoxinen geeignet. Sie sind selektiv, sensitiv, schnell, einfach in der Handhabung und eventuelle Clean up Verfahren sind häufig mit minimalem Aufwand durchzuführen. Zu den Leistungskriterien eines EIAs zählen die Sensitivität für die Toxindetektion, Genauigkeit der Resultate, Präzision der Analyse und Reproduzierbarkeit. Die Sensitivität eines EIAs wird durch die Affinität der spezifischen Antikörper für das Mykotoxin, durch Experimentierfehler, die Temperatur, das Detektionslevel des verwendeten Enzyms und durch die Inkubationszeit eingeschränkt. Die Leistungscharakteristika der Spezifität und die Genauigkeit eines EIAs sind abhängig von den Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen mykotoxinähnlichen Metaboliten, nicht spezifischen Adsorptionen der Immunreagenzien zur soliden Phase und der Interferenz von Probenextrakten (CANDLISH, 1991).

Für die Untersuchung des sehr lipophilen ZEA in Ölen und Fetten bzw. fettreichen Lebensmitteln (Kakao, Sahne) musste im Hinblick auf die Probenvorbereitung ein für immunchemische Verfahren unüblich hoher Aufwand betrieben werden. Ölige Lösungen sind weder im EIA noch in physikalisch-chemischen Verfahren direkt analysierbar. Das Grundprinzip des Extraktionsverfahrens basiert dabei auf einer von MAJERUS et al. (2009) beschriebenen alkalischen Extraktion, die gleichzeitig zu einer reversiblen hydrolytischen Ringöffnung von ZEA führt. In dieser Form ist ZEA relativ polar und damit einfach in polare Lösungsmittel (Wasser, Methanol) zu überführen. Hierzu eignet sich in besonderer Weise die flüssig-flüssig-Verteilungschromatographie. Nachdem hydrolysiertes ZEA in die polare Phase überführt wurde, konnte es durch Einstellen des pH-Wertes wieder in die ursprüngliche unpolare Struktur (geschlossener Ring) zurückversetzt werden. ZEA in methanolischen Lösungen war dann sehr einfach mittels EIA detektierbar.

5.1 Anwendbarkeit des eingesetzten EIA-Testverfahrens für ZEA

Der in dieser Arbeit optimierte Enzymimmuntest zeigte eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von ZEA in verschiedenen Lebensmitteln. Die Empfindlichkeit des Testsystems konnte mit einer Nachweisgrenze von 2 µg/kg (= 2 ng/g) für alle untersuchten Probenmaterialien ermittelt werden. Ähnliche Nachweisgrenzen eines ZEA-EIAs beschrieben USLEBER und MÄRTLBAUER (1998) mit 5 µg/kg und SEIDLER (2007) mit 6 µg/kg. Es wurde somit eine deutlich ausreichende Sensitivität erreicht, um eine Analytik weit unterhalb der erlaubten Höchstmenge von ZEA in Maiskeimöl von 400 µg/kg (Änderungsverordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission bezüglich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen vom 28. September 2007) zu ermöglichen. Für alle anderen untersuchten Produkte bzw. Produktgruppen wurden bisher keine nationalen oder internationalen Höchstmengen festgesetzt. Es war aber prinzipiell erforderlich, auch hier möglichst niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen.

Die Wiederfindungsraten in künstlich mit ZEA kontaminierten Proben lagen zwischen 64 % und maximal 222 % (siehe Tabelle 16), wobei der Median sowie der arithmetische Mittelwert dieser Werte bei etwa 130 % und der Median der ermittelten Variationskoeffizienten bei 11 % lagen. Die einmalige extreme mittlere Wiederfindung von 222 % wurde bei einem Toxinzusatz von 1 ng/g gemessen. Diese geringe ZEA-Zugabe liegt leicht unterhalb der rechnerischen Nachweisgrenze, wodurch das Zustandekommen dieses hohen Wertes erklärt werden kann. Die Wiederfindungsraten stiegen deutlich, je weniger Toxin zugesetzt wurde, was auf einen zunehmenden Probenmatriceinfluss zurückgeführt werden kann. In den Versuchen mit kakaohaltigen Erzeugnissen wurden vorwiegend geringe Toxinmengen eingesetzt, da nachgewiesen werden konnte, dass die Produkte natürlicherweise ebenfalls nur in geringen Mengen mit ZEA kontaminiert sind. Dadurch erklärt sich auch die geringe Abweichung der in Verordnung (EG) Nr. 401/2006 aufgeführten Anforderung für Methoden zur Bestimmung von ZEA von einer Wiederfindungsrate von 60-120 %. Überbefunde bzw. Wiederfindungsraten weit über 100 % können auch das Resultat einer Anreicherung der Toxine in der organischen Phase des Extraktionsmittels sein. Bei Solventien wie Acetonitril oder Aceton, die ein azeotropes Gemisch mit Wasser bilden und gute Extraktionseigenschaften aufweisen, kann es zu unerwünschten Phasentrennungseffekten kommen, was schließlich zur Anreicherung der Toxine in der organischen Phase führt (BISELLI, 2006).

Die Reproduzierbarkeit der Methode, welche anhand von Mehrfachuntersuchungen der unterschiedlichen Produktgruppen ermittelt wurde, war über alle Lebensmittelgruppen hinweg (Variationskoeffizient 24 %) deutlich besser als die in Verordnung (EG) Nr. 401/2006 aufgeführten Anforderungen für Methoden zur Bestimmung von ZEA (Variationskoeffizient 40 %).

5.2 Anwendbarkeit der eingesetzten Aufreinigungsverfahren für ZEA

Es zeigte sich, dass die alkalische Extraktion der Proben in einem alkalischen Methanol-Wasser-Gemisch, welche von MAJERUS et al. (2009) für Speiseöle beschrieben wurde, ebenfalls geeignet war, um die anderen genannten Probenmaterialien zu untersuchen.

Anhand des Versuches zur Lagerungsfähigkeit der Extrakte wird deutlich, dass nicht nur die EIA-Bestimmung, sondern auch der Extrakt zur Gesamtvariation beiträgt, sodass an unterschiedlichen Untersuchungstagen voneinander etwas abweichende Toxinkonzentrationen ermittelt wurden. Da die detektierten Toxinmengen im Allgemeinen sehr niedrig waren und das EIA-Verfahren sich gut als Screening-Methode eignet, vor allem aber da in dieser Dissertationsarbeit der prinzipielle Nachweis von ZEA in Kakaoerzeugnissen im Vordergrund stand, sind die erhaltenen Ergebnisse dennoch als zufriedenstellend anzusehen.

Einige Proben der Schokoladendesserts und der Speiseöle wurden zusätzlich mittels C-18-Kartuschen aufgereinigt, um anschließend im EIA untersucht zu werden. Die dabei ermittelten Wiederfindungsraten in künstlich kontaminierten Proben lagen im Bereich von 72-230 % mit einem Mittelwert von 133 % und einem Median von 116 %. Diese Ergebnisse ähnelten denen der Extraktion ohne weitere Aufreinigung durch C-18-Kartuschen. Der Vergleich der ermittelten ZEA-Konzentrationen der beiden Verfahren zeigte, dass bei geringen Toxinkonzentrationen (4-6 ng/g) die gemessenen Ergebnisse ähnlich sind, tendenziell bei Anwendung der Kartuschen etwas niedriger. Bei einem höher kontaminierten Maiskeimöl (106 ng/g) war ein „Verlust“ über die SPE-Reinigung zu beobachten. Durchschnittlich wurde dann nur noch etwa die Hälfte der ZEA-Menge im EIA detektiert. Grundsätzlich ist jeder zusätzliche Reinigungsschritt mit Ausbeuteverlusten des Analyten verbunden.

Eine Probe eines Schokoladendesserts wurde sowohl ohne als auch mit C-18-Kartuschen und daran anschließend einmalig zusätzlich unter Anwendung von Immunaффinitätssäulen im EIA untersucht. Es zeigte sich ebenfalls eine niedrigere nachweisbare Toxinkonzentration bei Anwendung der SPE als auch eine noch etwas niedrigere Konzentration bei Anwendung der Immunaффinitätssäulen. Ausbeuteverluste bei Anwendung von Immunaффinitätssäulen sind durchaus möglich.

5.3 Methodenvergleich EIA und HPLC

Grundsätzlich lagen sowohl bei Anwendung von Methode 1 als auch von Methode 2 der HPLC die ermittelten ZEA-Konzentrationen deutlich unterhalb derjenigen der mittels EIA gemessenen Toxingehalte. So lag die Wiederfindung von ZEA (im Vergleich zu den EIA-Ergebnissen) bei Methode 2 nur zwischen 4 % und maximal 40 % (durchschnittlich 17 %). Bei den hier gemessenen Proben handelte es sich um natürlich kontaminierte Proben, welche nur eine geringe ZEA-Belastung aufweisen, was die analytische quantitative Übereinstimmung zweier Verfahren prinzipiell erschwert. Quantitativ sind bei solchen geringen Toxinkonzentrationen Überschätzungen im EIA möglich, qualitativ ist jedoch ein sicherer Nachweis gegeben. Grundsätzlich sind höhere Messwerte im EIA im Vergleich zur HPLC möglich, bedingt durch die starken Kreuzreaktionen des Testsystems mit allen bekannten ZEA-Analoga. Dies ist als charakteristisch für Antikörper gegen ZEA anzusehen (CHA et al., 2012; DIETRICH et al., 1995; DIXON et al., 1987; LIU et al., 1985; SEIDLER, 2007; THONGRUSSAMEE et al., 2008; USLEBER et al., 1992; USLEBER und MÄRTLBAUER, 1998). Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass die Menge des in der HPLC verwendeten Lösungsmittels sehr gering war (meist 125 µl). Eventuell ist diese Menge nicht ausreichend, um ZEA vollständig darin lösen zu können. Das Lösen in einer größeren Menge Flüssigkeit war allerdings auch nicht von Vorteil, da durch die geringe Toxinkonzentration die Verdünnung so zu hoch war und ZEA nicht mehr detektiert werden konnte. Schwierigkeiten bei der Rücklösung nach Extrakt Trocknung im Rotationsverdampfer wurden für ZEA auch in anderen Untersuchungen beobachtet (USLEBER, persönliche Mitteilung). Schlussfolgern lässt sich anhand dieser Ergebnisse, dass die angewandten Methoden für die Extraktion von ZEA nicht optimal und somit verbesserungswürdig zu sein scheinen. Auch REN et al. (2006) erhielten in ihren Messungen (UPLC-MS/MS, Multitoxinmethode) bei Anwendung eines

Acetonitril-Gemisches bei der Extraktion geringere Werte als bei Anwendung von Methanol-Gemischen.

In der HPLC-Fraktionierung konnte eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen des EIAs erzielt werden. Die Wiederfindung des HPLC-Extrakts im EIA betrug 114 % des HPLC-Wertes. Es lässt sich daraus schließen, dass sich durch die Verwendung eines reinen Extraktes Überschätzungen des EIAs minimieren lassen.

Durch die Etablierung von Methode 2 der HPLC war es möglich, die Proben deutlich besser aufzureinigen. Wichtig ist die richtige Interpretation der Ergebnisse (qualitativ) und eine Überprüfung mit anderen analytischen Nachweisverfahren.

5.4 Weiterführende Untersuchungen mittels LC/MS-MS

Um die eigenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden drei ZEA-positive Schokoladendessertproben an das Nationale Referenzlabor für Mykotoxine (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR; Dr. Horst Klaffke) in Berlin geschickt und dort mittels LC-MS/MS untersucht. Der dort detektierte Gehalt an Zearalanon ist vermutlich auf die Kreuzreaktion dieses ZEA-Metaboliten im EIA zurückzuführen. In einer anderen Probe wurde kein ZEA bzw. keine Metaboliten gemessen, was auf die schon erwähnte Überschätzung des EIAs zurückzuführen sein könnte. In der dritten Probe konnte der Nachweis von ZEA mit einer sehr ähnlichen Konzentration bestätigt werden. Da auch das HPLC-MS/MS-Verfahren für diese Matrix nicht umfänglich validiert war, ist die quantitativ schlechte Übereinstimmung nicht verwunderlich. Ein wesentliches Ergebnis dieser Vergleichsuntersuchung war aber, dass damit fast zweifelsfrei das erstmals in der vorliegenden Arbeit beschriebene Vorkommen von ZEA in kakaohaltigen Lebensmitteln demonstriert werden konnte. Die Tatsache, dass in einer Probe mittels HPLC-MS/MS nicht ZEA, sondern das strukturverwandte und ebenfalls östrogenartig wirksame Zearalanon nachgewiesen wurde, zeigt den erforderlichen weiteren Forschungsbedarf auf. Insbesondere stellt sich hier die Frage nach der Kontaminationsursache von Kakao. Es ist beispielsweise die Frage, ob Fusarien oder aber andere Schimmelpilze als Toxinbildner ursächlich verantwortlich sind. Zum anderen ist die Frage nach dem Kontaminationszeitpunkt (pre- oder postharvest) zu klären.

5.5 Aussagekraft der Laborvergleichsstudie

Anhand der Vergleiche der mittels diesem EIA-Verfahren gemessenen ZEA-Konzentrationen der Proben der Laborvergleichsstudie mit den Mittelwerten aller teilnehmenden Laboratorien wird ersichtlich, dass durch das angewandte Verfahren zwar nicht genau die gemessenen Mittelwerte der Ölproben detektiert werden, es dennoch aber gut geeignet ist, um ZEA in Speiseölen nachzuweisen. So wurde in den Proben A und B mittels EIA etwas mehr ZEA detektiert als durchschnittlich von den anderen Teilnehmern und in Probe C etwas weniger. In der Testlösung wurde durch die Messung im EIA fast genau der Mittelwert aller an der Messung beteiligten Labore erreicht.

Die höhere Selektivität der HPLC-MS/MS gegenüber der HPLC-Fluoreszenz hat sich in dieser Laborvergleichsstudie insbesondere bei den natürlich belasteten Ölproben B und C gezeigt und bestätigt. Die HPLC-MS/MS (mit ^{13}C -ZEA als interner Standard) ist als Methode der Wahl zum Nachweis von ZEA in Speiseölen zu betrachten. Nichtsdestotrotz stellt die Fluoreszenzmessung eine geeignete Alternative zur MS/MS-Detektion dar, setzt jedoch eine effiziente Probenaufreinigung voraus. Das von der Professur für Milchwissenschaften der JLU Gießen angewandte EIA-Verfahren liefert akzeptable Werte und im Vergleich zu anderen Analysemethoden ist es schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen. Weiterhin konnten, im Gegensatz zu drei anderen Verfahren, keine statistischen Ausreißer der so gemessenen Konzentrationen, festgestellt werden. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl konnten keine allgemeingültigen Rückschlüsse zur Leistungsfähigkeit der Aufarbeitungsmethoden gezogen werden.

Durch die Überprüfung der Testrobustheit des enzymimmunologischen Nachweises von ZEA in Speiseölen anhand der Laborvergleichsstudie der BAM (Kapitel 4.4.1) wird deutlich, dass die gemessenen ZEA-Konzentrationen relativ ähnlich sind. Dies zeigt erneut, dass das angewandte Verfahren gut geeignet ist um ZEA in Speiseölen nachzuweisen. Die erhaltenen Schwankungen sind auf die Variabilität des EIAs, die Variabilität des Standards und der Extraktion zurückzuführen.

5.6 Vorkommen von ZEA in verschiedenen Lebensmittelgruppen

5.6.1 Speiseöle

Im EIA wurden alle untersuchten Maiskeimöle positiv auf ZEA getestet (31-106 ng/g). Keines erreichte jedoch die derzeit in der EU gültige erlaubte Höchstmenge von 400 µg/kg (Änderungsverordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission bezüglich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen vom 28. September 2007). ZEA wurde ebenso in mehreren anderen Speiseölen detektiert, die Toxinkonzentration war aber typischerweise geringer (2-47 ng/g). Auch in allen untersuchten Proben von Walnussöl (n = 5), Erdnussöl (n = 2), Olivenöl (n = 2) und Sesamöl (n = 2) konnte ZEA nachgewiesen werden. In einigen anderen Ölsorten konnte hingegen kein ZEA gefunden werden (siehe Tabelle 24). Zu den acht am höchsten mit ZEA kontaminierten Ölproben gehörten bis auf eine Sesamölprobe ausschließlich Maiskeimölproben. Auch in anderen Studien wurden bisher ähnliche Gehalte an ZEA (um 100 ng/g) in Maiskeimöl festgestellt (KAPPENSTEIN et al., 2005b; SIEGEL et al., 2010), jedoch wurde einmalig auch eine ZEA-Konzentration von 4,6 mg/kg ermittelt (LAUREN und RINGROSE, 1997). Weiterhin konnte von KAPPENSTEIN et al. (2005b) auch in Sojaöl und in Weizenkeimöl das Vorkommen von ZEA bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurden in anderen Ölsorten bisher keine Kontaminationen mit diesem Mykotoxin festgestellt.

Mittlerweile wurden einige Analyseverfahren zum Nachweis von ZEA in Speiseölen entwickelt (KAPPENSTEIN et al., 2005b; KOCHER, 2006; GOTTSCHALK et al., 2009; MAJERUS et al., 2009; SIEGEL et al., 2010), die alle sowohl gewisse Vor- als auch Nachteile mit sich bringen (vgl. Kapitel 2.8.1.2).

5.6.2 Sahne

Da es bisher keine Studien über das Vorkommen von ZEA in fettreichen Milcherzeugnissen gab, sollte der Frage nachgegangen werden, ob dieses Mykotoxin sich darin anreichern kann. Jedoch konnte mittels enzymimmunologischen Nachweis in reiner Sahne (n = 38) kein ZEA nachgewiesen werden. Zwei Proben von sprühfertiger Schokoladensahne wiesen allerdings geringe Gehalte an ZEA auf (5 ng/g bzw. 6,4 ng/g). Eine dieser Proben wurde zusätzlich mittels HPLC untersucht; das Vorkommen von ZEA wurde qualitativ bestätigt. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass von den

Milch-liefernden Tieren keine großen ZEA-Mengen über das Futter aufgenommen wurden, sodass keine nachweisbare Toxinanreicherung stattfinden konnte. Kontrollierte Fütterungsversuche mit anschließender Sahneherstellung aus dieser Milch könnten weiteren Aufschluss über das Verhalten dieses lipophilen Mykotoxins liefern.

5.6.3 Kakaohaltige Milchmischgetränke

Sieben der 28 mittels EIA untersuchten Proben konnten positiv auf ZEA getestet werden (25 %). Die ZEA-Konzentrationen lagen dabei in dem Bereich von 1,5-6,2 ng/g (durchschnittlich 3,6 ng/g). Mittels HPLC-Analyse konnte das Vorkommen von ZEA erneut qualitativ bestätigt werden. Dass zwei der natürlich kontaminierten Proben Kakaogehalte über der Norm aufwiesen (14 % Schweizer Schokolade bzw. 2,2 % fettarmes Kakaopulver aus Arriba Edelkakao), bekräftigt die Annahme des Eintrags von ZEA über den Kakao.

Um diese Aussage zu stützen, wurden im Rahmen dieser Studie weitere kakaohaltige Lebensmittel (Schokoladendesserts) untersucht (siehe Kapitel 5.6.4).

Zusätzlich wurden in einer parallel laufenden Dissertationsarbeit der Professur für Milchwissenschaften der JLU Gießen (HAIN, in Vorbereitung) Schokolade, schokoladenhaltige Lebensmittel sowie Kakaobohnen enzymimmunologisch auf das Vorkommen von ZEA untersucht. Auch hier wurden Kontaminationen der Proben festgestellt. Weiterhin wurde im Rahmen der erwähnten Arbeit eine Probe einer Kakaobohnenschale zur Klärung der vorhandenen Pilzisolat (der eventuellen ZEA-Bildner) im Max Rubner Institut (Prof. Dr. Rolf Geisen) untersucht. Dazu wurde die Probe auf Malt-Agar, Yeast-Agar sowie Rose-Bengal-Agar angezüchtet, um anschließend mittels ITS-Sequenzierung (internal transcribed spacer) untersucht zu werden. Das Ergebnis war, dass es sich bei dem angezüchteten Pilzisolat mit hoher Wahrscheinlichkeit um *Eurotium rubrum* handelt. Dieser Pilz ist die Hauptfruchtform (Teleomorph) des *Aspergillus*. *Eurotium* ist aber auch die Geschlechtsform von Fusarien. Seine Wachstumsbedingungen liegen zwischen 5-40 °C bei einem Optimum von 25-27 °C. In einigen Studien wurde bereits die Fähigkeit der Mykotoxinbildung erwähnt. Genaue Daten über die Toxizität existieren aber noch nicht. Grundsätzlich wächst dieser Pilz eher in warmen Regionen und kommt auf vielen Getreiden wie Mais, Weizen oder Reis vor. Jedoch wurde er aber auch

schon auf anderen Produkten wie Nüssen, Fisch, Sesam sowie auch auf Kakaobohnen gefunden (PITT und HOCKING, 2009). Insofern wäre *Eurotium rubrum* ein aussichtsreicher Kandidat für die Untersuchung der Toxinbildung in Kakao. Ob die Bildung von ZEA durch andere Pilze als Fusarien möglich ist, sollte weiter untersucht werden.

5.6.4 Schokoladendesserts

Emzymimmunologisch wurden 63 verschiedenartige Schokoladendesserts untersucht, wovon in rund der Hälfte (52 %) ZEA nachgewiesen werden konnte. Die Konzentrationen lagen in dem Bereich von 1,1-9,8 ng/g bei einem mittleren Gehalt von $3,4 \pm 2$ ng/g. In der HPLC-Analyse konnte in den untersuchten Proben ebenfalls das Vorkommen von ZEA bestätigt werden, jedoch mit einer typischerweise geringeren Konzentration. Weiterhin wurden drei Proben mittels LC-MS/MS untersucht, um weiteren Aufschluss über die Mykotoxin-Kontamination zu erlangen (vergleiche Kapitel 5.4).

Auffällig ist, dass 100 % der untersuchten „Mousse au chocolat“ positiv auf ZEA getestet wurden. Diese enthält mehr Kakao als gewöhnliche Schokoladenpudding-Proben (vergleiche Kapitel 4.2.4). Ebenso konnte in allen der untersuchten Schokoladenmilchreis-Proben und Grießdesserts ZEA nachgewiesen werden. Bei diesen beiden Gruppen ist das Produkt in einen unteren schokoladenhaltigen Teil und einen oberen Reis/Grieß-Bereich untergliedert. Bei den EIA-Untersuchungen wurde vorwiegend die enthaltene „Schokoladensoße“ extrahiert und anschließend untersucht. Folglich enthielt der ausgewählte Probenanteil ebenfalls einen hohen Kakaoanteil, was das häufige Vorkommen von ZEA in diesen Produktgruppen erklärt.

5.7 Schlussfolgerungen

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für den Untersuchungszeitraum 2010, dass handelsübliche Speiseöle oftmals mit ZEA kontaminiert sind. Wie bereits aus früheren Studien bekannt (KAPPENSTEIN et al., 2005b), ist vorrangig in Maiskeimölen oftmals ZEA enthalten. Keines der hier untersuchten Öle überstieg jedoch die erlaubte Höchstmenge von 400 µg/kg

5. DISKUSSION

(Änderungsverordnung (EG) Nr. 1126/2007 der Kommission bezüglich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen vom 28. September 2007).

Für handelsübliche deutsche Schlagsahne liegen keine Anhaltspunkte für eine relevante ZEA-Kontamination vor. Damit dürfte auch für Milchfett kein relevantes carry-over von ZEA gegeben sein.

Kakaohaltige Produkte weisen offensichtlich häufig eine geringe Kontamination mit ZEA auf. Zwar existieren bisher keine Höchstmengenregelungen für diese Lebensmittel, im Hinblick auf den TDI (0,25 µg/kg) und die Verzehrsmengen, gerade von Kindern, kann jedoch über kakaohaltige Milchmischerzeugnisse eine relevante ZEA-Menge aufgenommen werden. Daher sind weitere Studien zu dieser Problematik angezeigt.

Die in dieser Arbeit validierten Testsysteme erwiesen sich als geeignet für die Untersuchung aller erwähnten Produktgruppen. Jedoch ist das Verfahren ausbaufähig und kann optimiert werden. Im Hinblick auf quantitative Referenzverfahren ist weitere Forschung zur Methodenentwicklung erforderlich. Besonders als Screening-Methode und für einen hohen Probendurchlauf stellt das hier beschriebene EIA-Verfahren prinzipiell jedoch eine praktikable Möglichkeit für die Routineuntersuchung dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Optimierung und Validierung enzymimmunchemischer (EIA) Methoden zur Untersuchung von Speiseölen, Sahne und kakaohaltigen Milchmischerzeugnissen auf das Mykotoxin Zearalenon (ZEA) sowie mit der Bestimmung der Gehalte dieses Toxins in Lebensmitteln des deutschen Marktes im Jahre 2010. Ein Teil der Proben wurde zur Überprüfung der EIA-Systeme zusätzlich mittels HPLC und LC/MS-MS untersucht.

Da ZEA stark lipophil ist, kann es während der Speiseölherstellung in diese übertragen bzw. sogar dort angereichert werden. Da Sahne ebenfalls einen hohen Fettanteil besitzt, sollte überprüft werden, ob ZEA auch in dieser Produktgruppe vorkommt - zumal bisherige Untersuchungen gezeigt hatten, dass ein carry over von ZEA in Milch möglich ist (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992). Durch einen Zufallsbefund wurde der weitere Fokus dieser Arbeit auf das Vorkommen von ZEA in kakaohaltigen Lebensmitteln gelenkt.

Zur Detektion von ZEA wurde ein kompetitiver direkter Enzymimmuntest (EIA) mit einer durchschnittlichen Nachweisgrenze der ZEA-Standardkurve von 89 ± 35 pg/ml und einer 50 %-Inhibitionsdosis von 388 ± 100 pg/ml verwendet. Zur Probenextraktion wurde eine alkalische Flüssig-Flüssig-Partitionierung, welche von MAJERUS et al. (2009) beschrieben wurde, angewandt. Die erzielten Nachweisgrenzen für alle untersuchten Probenmaterialien im EIA ($2 \mu\text{g/kg}$) lagen deutlich unterhalb der für ZEA in Maiskeimöl geltenden Höchstmengen ($400 \mu\text{g/kg}$). Für alle anderen Produktgruppen existieren keine Grenzwerte. Wiederfindungsraten von einem arithmetischen Mittelwert von 130 % für ZEA in künstlich kontaminierten Proben und ein Variationskoeffizient von 24 % für die Reproduzierbarkeit der Methode, welche anhand von Mehrfachuntersuchungen ermittelt wurde, belegten die Einsetzbarkeit der EIA-Methoden. Zur weiteren Aufreinigung bestimmter Proben wurden C-18-Kartuschen sowie Immunaффinitätssäulen eingesetzt. In den durchgeführten Vergleichsuntersuchungen (HPLC, LC-MS/MS) konnte das Vorhandensein von ZEA qualitativ bestätigt werden.

Von den untersuchten 31 Speiseölen konnten 74 % positiv auf ZEA getestet werden. Maiskeimöle waren dabei durchschnittlich am höchsten belastet ($55,9 \pm 24,4$ ng/g). Mit einem Maximalwert eines Öls von 105,6 ng/g wurde die geltende Höchstmenge von keiner Probe überschritten. Auch in anderen Ölsorten (Walnussöl, Erdnussöl, Distelöl, Olivenöl,

Sesamöl, Kürbiskernöl, Hanföl, Weizenkeimöl und Leinsamenöl) konnte zum Teil erstmalig ZEA nachgewiesen werden.

Während reine Schlagsahne ausnahmslos ZEA-negativ war, wurde in zwei Proben sprühfertiger Schokoladensahne ZEA in Gehalten deutlich oberhalb der Nachweisgrenze detektiert (5 ng/g bzw. 6,4 ng/g). Aus diesem Grund wurden weitere kakaohaltige Lebensmittel untersucht. So wurden von den 28 untersuchten kakaohaltigen Milchmischgetränken 25 % positiv auf ZEA getestet (1,5-6,2 ng/g). Weiterhin wurden enzymimmunologisch 63 verschiedenartige Schokoladendesserts untersucht, wovon in rund der Hälfte (52 %) ZEA nachgewiesen werden konnte (1,1-9,8 ng/g).

Die Ergebnisse weisen erstmalig auf das Vorkommen von ZEA in kakaohaltigen Produkten hin. Sahneprodukte hingegen scheinen keine relevante Aufnahmequelle für dieses Mykotoxin zu sein. Weiterhin konnte in allen untersuchten Maiskeimölen (in ähnlichen Konzentrationsbereichen früherer Studien) und in einigen anderen Speiseölen ZEA nachgewiesen werden.

7 SUMMARY

The presented study describes the optimization and validation of an enzyme immunoassay (EIA) suitable for the analysis of edible oils, whipped cream and milk mixed products containing cocoa for the mycotoxin zearalenone (ZEA). The method was used to determine the levels of this mycotoxin in foods from the German retail market during the year 2010. Additionally, some of the samples were also analysed using HPLC methods and a LC/MS-MS method for evaluation purposes.

Because ZEA is highly lipophilic, it is transferred into or even enriched in the oil fraction during the production of edible oils. Due to the high fat content of whipped cream, the aim was to examine whether ZEA occurs in this group of products as well. A number of former studies have shown that carry-over effects for ZEA in milk are possible (HAGLER et al., 1980; MIROCHA et al., 1981; PRELUSKY et al., 1990; USLEBER et al., 1992) but, for most analytical purposes only the skimmed milk fractions were therefore examined. By an incidental finding the focus of this study continued to direct on the occurrence of ZEA in cocoa containing products.

A competitive direct enzyme immunoassay (EIA) with a mean detection limit of the ZEA standard curve of 89 ± 35 pg/ml and an IC_{50} of 388 ± 100 pg/ml was used for detection. The alkaline liquid-liquid partitioning was used for sample preparation as described by MAJERUS et al. (2009). The detection limits of the EIA for all groups of products ($2 \mu\text{g/kg}$) were all well below the European Union maximum permitted limit of $400 \mu\text{g/kg}$ for ZEA in refined maize germ oil. There are no maximum permitted limits for all other examined products. Recoveries obtained for spiked samples with an arithmetic mean of 130 % and a relative standard deviation of 24 % for the repeatability of the method (determined by multiple examinations) demonstrated the suitability of the EIA-method for general routine analysis. For further purification and clean-up of certain samples C-18-cartridges and immunoaffinity columns were used. In the performed comparative studies (HPLC, LC-MS/MS) the occurrence of ZEA in the examined products could be qualitatively confirmed.

ZEA was found in 74 % of the 31 examined samples of edible oils. On average, maize oils were thereby reaching the comparably highest values of all products (55.9 ± 24.4 ng/g). With a maximum value of 105.6 ng/g none of the samples exceeded the maximum permitted level. In other sorts of oils (walnut oil, peanut oil, safflower oil, olive oil, sesame

7. SUMMARY

oil, pumpkin seed oil, hempseed oil, wheat germ oil and linseed oil) ZEA was detected as well (in some cases for the first time).

While pure whipped cream was without exception free from detectable ZEA-concentrations, two samples of cocoa containing whipped cream in a spray can contained ZEA with concentrations clearly above the detection limit (5 ng/g respectively 6.4 ng/g). That was the reason for focusing on other food products containing cocoa. ZEA was found in 25 % of the 28 examined samples of milk mixed drinks containing cocoa (1.5-6.2 ng/g). Furthermore, 63 different chocolate desserts were enzyme-immunologically tested; about half of them (52 %) contained ZEA in a concentration range from 1.1-9.8 ng/g.

The results of the analytical test indicate the presence of ZEA in cocoa containing food products for the first time. By contrast, pure whipped cream products do not seem to be a relevant dietary source of this mycotoxin. Additionally, in all analyzed samples of maize oil ZEA could be found (in a similar concentration range reported earlier) as well as in some other edible oils.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABID-ESSEFI, S., C. BOUAZIZ, E. EL GOLLI-BENNOUR, Z. OUANES und H. BACHA (2009):

Comparative Study of Toxic Effects of Zearalenone and Its Two Major Metabolites α -Zearalenol and β -Zearalenol on Cultured Human Caco-2 Cells
Journal of Biochemical and Molecular Toxicology **23**, 233-243

AHAMAD, S., J. S. FOSTER, A. BUKOVSKY und J. WIMALASENA (2001):

Signal Transduction through the Ras/Erk Pathway Is Essential for the Mycoestrogen Zearalenone-Induced Cell-Cycle Progression in MCF-7 Cells
Molecular Carcinogenesis **30**, 88-98

ALLEN, N. K., S. AAKHUSALLEN und C. J. MIROCHA (1980):

Effect of zearalenone in reproduction in chickens
Poultry Science **59**, 1577

AMÉZQUETA, S., E. GONZÁLEZ-PENAS, M. MURILLO und A. LÓPEZ DE CERAIN (2004):

Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans
Food Additives and Contaminants **21**, 1096-1106

AMÉZQUETA, S., E. GONZÁLEZ-PENAS, M. MURILLO und A. LÓPEZ DE CERAIN (2005):

Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: Effect of shelling
Food Additives and Contaminants **22**, 590-596

- ANONYM (ohne Jahr) Bund/Länder-Arbeitsgruppe „ADV in der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung“. ADV-Kodierungskataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittel-Monitoring. Katalog Nr. 3: Matrixkodex. Verfügbar unter:
http://www.bvl.bund.de/cln_027/nn_520288/DE/01_Lebensmittel/01_Sicherheit_Kontrollen09_datenmanagement/datenmanagement_node.html_nnn=true
- AOYAMA, K., E. ISHIKURO, M. NISHIWAKI und M. ICHINOE (2008):
Zearalenone Contamination and the Causative Fungi in Sorghum
Journal of the Food Hygienic Society of Japan **50**, 47-51
- ARDHANA, M. M. und G. H. FLEET (2003):
The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia
International Journal of Food Microbiology **86**, 87-99
- AYED, Y., I. AYED-BOUSSEMA, Z. OUANES und H. BACHA (2011):
In vitro and *in vivo* induction of chromosome aberrations by alpha- and beta-zearalenols: Comparison with zearalenone
Mutation Research **726**, 42-46
- BAGNERIS, R. W., J. A. GAUL und G. M. WARE (1986):
Liquid chromatographic determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection
Journal of the Association of Official Analytical Chemists **69**, 894-898
- BALTES W. und R. MATTISEK (2011):
Lebensmittelchemie
Springer-Verlag, 7. Auflage, Heidelberg Dordrecht London New York, 398-402
- BANDERA, E. V., U. CHANDRAN, Y. LIN, S. ISUKAPALLY, I. MARSHALL, M. KING und H. ZARBL (2011):
Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey Girls
Science of the Total Environment **409**, 5221-5227

8. LITERATURVERZEICHNIS

BASSEN, B. und G. THIELERT (2000):

Fusarientoxine (DON und ZEA) in Lebensmitteln

Mycotoxin Research **16 A**, 75-78

BAUGH, P. J. (1997):

Gaschromatographie - Eine anwenderorientierte Darstellung

Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden

BENNETT, G. A. und O. L. SHOTWELL (1979):

Zearalenone in Cereal Grains

Journal of the American Oil Chemists Society **56**, 812-819

BENNETT, G. A., O. L. SHOTWELL und W. F. KWOLEK (1985):

Liquid chromatographic determination of α -zearalenol und zearalenone in corn:

Collaborative Study

Journal of the Association of Official Analytical Chemists **68**, 958-961

BERTHILLER, F., M. SULYOK, R. KRŠKA und R. SCHUHMACHER (2007):

Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals

International Journal of Food Microbiology **119**, 33-37

BIEHL, M. L., D. B. PRELUSKY, G. D. KORITZ, K. E. HARTIN, W. B. BUCK und H. L. TRENHOLM (1993):

Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs

Toxicology and Applied Pharmacology **121**, 152-159

BISELLI, S. (2006):

Analytische Methoden für die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **1**, 106-114

BOERMANS, H. J. und M. C. K. LEUNG (2007):

Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence und risk assessment
International Journal of Food Microbiology **119**, 95-102

BONVEHI, J. S. (2004):

Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate
Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**, 6347-6352

BRENN-STRUCKHOFOVA, Z., C. FÜREDER, M. CICHNA-MARKL und
E. RAZZAZI-FAZELI (2009):

Co-isolation of deoxynivalenol and zearalenone with sol-gel immunoaffinity
columns for their determination in wheat and wheat products
Journal of Chromatography A **1216**, 5828-5837

BURKIN, A. A., G. P. KONONENKO und N. A. SOBOLEVA (2002):

Production and analytical properties of antibodies with high specificity to
zearalenone
Applied Biochemistry and Microbiology **38**, 263–268

CALDWELL, R. W., J. TUIE, M. STOB und R. BALDWIN (1970):

Zearalenone Production by *Fusarium* Species
Applied Microbiology **20**, 31-34

CANDLISH, A. A. G. (1991):

The determination of mycotoxins in animal feeds by biological methods
In: Smith, J. E. und R. S. Henderson (Hrsg.): Mycotoxins and Animal Foods
CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 223-246

CAPRIOTTI, A. L., P. FOGLIA, R. GUBBIOTTI, C. ROCCIA, R. SAMPERI und A.
LAGANÀ (2010):

Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure
photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins
subjected to commission regulation (EC) No. 1881/2006 in cereals
Journal of Chromatography A **1217**, 6044-6051

- CHA, S.-H., S.-H. KIM, K. BISCHOFF, H.-J. KIM, S.-W. SON und H.-G. KANG (2012):
Production of a highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and
its application in an enzyme-linked immunosorbent assay
Journal of Veterinary Science **13**, 119-125
- CHAKRABARTI, D. K. und S. GHOSAL (1986):
Occurrence of free and conjugated 12,13-epoxytrichothecenes and zearalenone in
banana fruits infected with *Fusarium moniliforme*
Applied and Environmental Microbiology **51**, 217-219
- CHANG, K., H. J. KURTZ und C. J. MIROCHA (1979):
Effects of mycotoxin zearalenone on swine reproduction
American Journal of Veterinary Research **40**, 1260-1267
- COE, S. D. und M. D. COE (1999):
Die wahre Geschichte der Schokolade
Fischer Verlag, Frankfurt am Main
- COPETTI, M. V., B. T. IAMANAKA, J. L. PEREIRA, D. P. LEMES, F. NAKANO und
M. H. TANIWAKI (2012):
Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil
Food Control **26**, 36–41
- CRAMER, B., M. BRETZ und H.-U. HUMPF (2007):
Stable isotope dilution analysis of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone
Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**, 8353-8358
- CURTICAPEAN, A., F. TOMA, M. TARCEA, M. CURTICAPEAN, V.
SAMARGHITAN, I. A. POB und A. GULEA (2011):
HPLC method validation for simultaneous determination of three mycotoxins from
corn seeds
Croatica Chemica Acta **84**, 413-417

CURTUI, V., A. BROCKMEYER, R. DIETRICH, O. KAPPENSTEIN, H. KLAFFKE, J. LEPSCHY, E. MÄRTLBAUR, E. SCHNEIDER, C. SEIDLER, G. THIELERT, E. USLEBER, R. WEBER und J. WOLFF (2004):

Analytik und Vorkommen wichtiger Fusarientoxine (Deoxynivalenol, Zearalenon) sowie Aufnahme dieser Toxine durch den deutschen Verbraucher
Verbundforschungsprojekt 00HS 055, Abschlussbericht, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

DÄNICKE, S., K.-P. BRÜSSOW, T. GOYARTS, H. VALENTA, K.-H. UEBERSCHÄR und U. TIEMANN (2007a):

On the transfer on the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation
Food and Chemical Toxicology **45**, 1565-1574

DÄNICKE, S., H. VALENTA, K.-H. UEBERSCHÄR und S. MATTHES (2007b):

On the interactions between Fusarium toxin-contaminated wheat and non-starch-polysaccharide hydrolysing enzymes in turkey diets on performance, health and carry-over of deoxynivalenol and zearalenone
British Poultry Science **48**, 39-48

DÄNICKE, S., K. MATTHÄUS, P. LEBZIEN, H. VALENTA, K. STEMME, K.-H. UEBERSCHÄR, E. RAZZAZI-FAZELI, J. BÖHM und G. FLACHOWSKY (2005):

Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **89**, 303-315

DÄNICKE, S., K.-H. UEBERSCHÄR, I. HALLE, S. MATTHES, H. VALENTA und G. FLACHOWSKY (2001):

On the effects of fusarium toxin contaminated maize in laying hen feeding
Mycotoxin Research **17 A**, 62-66

DÄNICKE, S. und H. VALENTA (1999):

Mykotoxine im Futter: Gefahr für landwirtschaftliche Nutztiere?
Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten **2**, 10-13

DEAN, J. R. (2009):

Extraction Techniques in Analytical Sciences
John Wiley & Sons Ltd, Chichester

DE MAGALHAES, J. T., G. A. SODRE, H. VISCOGLIOSI und M.-F. GRENIER-LOUSTALOT (2011):

Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans
Food Control **22**, 744-748

DE NIJS, M., F. ROMBOOTS und S. NOTERMANS (1996):

Fusarium molds and their mycotoxins
Journal of Food Safety **16**, 15-58

DE SAEGER, S., L. SIBANDA und C. VAN PETEGHEM (2003):

Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography
Analytica Chimica Acta **487**, 137-143

DEUERLING, A. (2010):

Die Physik und Chemie der „Mousse au Chocolat“
Schriftliche Hausarbeit für die erste Staatsexamensprüfung für ein Lehramt an Realschulen, Julius-Maximilian-Universität Würzburg

DIETRICH, R., E. SCHNEIDER, E. USLEBER und E. MÄRTLBAUER (1995):

Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins
Natural Toxins **3**, 288-293

DIN-TERM (2001):

Beschichtungsstoffe – Begriffe aus DIN-Normen
Poppdruck, Langenhagen

- DIXON, D. E., R. L. WARNER, B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1987):
Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxins zearalenone and α -zearalenol
Journal of Agricultural and Food Chemistry **35**, 122-126
- D'MELLO, J. P. F., C. M. PLACINTA und A. M. C. MACDONALD (1999):
Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity
Animal Feed Science and Technology **80**, 183-205
- DÖLL, S., S. DÄNICKE, K.-H. UEBERSCHÄR, H. VALENTA und G. FLACHOWSKY (2003):
Fusarium Toxin Residues in Physiological Samples of Piglets
Mycotoxin Research **19**, 171-175
- DONG, M., X. J. HE, P. TULAYAKUL, J.-Y. LI, K.-S. DONG, N. MANABE, H. NAKAYAMA und S. KUMAGAI (2010):
The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats
Toxicon **55**, 523-530
- DORS, G. C., V. BIERHALS und E. BADIALE-FURLONG (2011):
Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins
Ciência e Tecnologia de Alimentos **31**, 172-177
- DUCA, R. C., F. BRAVIN, M. DELAFORGE, L. VLADESCU, I. A. BADEA und R. D. CRISTE (2009):
Development of a new HPLC method used for determination of zearalenone and its metabolites in broiler samples. Influence of zearalenone on the nutritional properties of broiler meat
Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**, 10497–10504
- ECKARDT, G. (2010):
Mykotoxine: Zearalenon und seine Metabolite – Analytik mittels IAC-LC/MS-MS
Diplomica Verlag GmbH, Hamburg

8. LITERATURVERZEICHNIS

ENGELHARDT, H. (1986):

Practice of High Performance Liquid Chromatography - Applications, Equipment and Quantitative Analysis
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo

ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry **8**, 871-874

ERASMUSON, A. F., B. G. SCAHILL und D. M. WEST (1994):

Natural zearanol (α -zearalanol) in the urine of pasture-fed animals
Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**, 2721-2725

ETIENNE, M. und J. Y. DOURMAD (1994):

Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review
Livestock Production Science **40**, 99-113

FLANNIGAN, B. (1991):

Mycotoxins
In: D'Mello, J. P. F., Duffus, C. M. und Duffus, J. H. (Hrsg.): Toxic Substances in Crop Plants
The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 226-257

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2012):

Food and Agricultural commodities production
faostat3.fao.org/ (Stand: 23.04.2014)

GAJECKA, M., E. JAKIMIUK, E. SKORSKA-WYSZYNSKA, L. ZIELONKA, M. POLAK, A. PALUSZEWSKI, L. RYBARCZYK und M. GAJECKI (2004):

Influence of zearalenone micotoxicosis on selected immunological, haematological and biochemical indexes of blood plasma in bitches
Journal of Veterinary Science **7**, 175-180

GALENSA, R., U. ENGELHARDT, M. BAHADIR und H. BÖHM (1995):

Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

GONZALEZ PEREYRA, M. L., V. A. ALONSO, R. SAGER, M. B. MORLACO, C. E. MAGNOLI, A. L. ASTORECA, C. A. R. ROSA, S. M. CHIACCHIERA, A. M. DALCERO und L. R. CAVAGLIERI (2008):

Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage

Journal of Applied Microbiology **104**, 1034-1041

GONZALEZ PEREYRA, M. L., C. A. R. ROSA, A. M. DALCERO und L. R. CAVAGLIERI (2011):

Mycobiotica and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries

Letters in Applied Microbiology **53**, 649-655

GOTTSCHALK, C., J. BARTHEL, U. AULWURM, G. ENGELHARDT, J. BAUER, K. MEYER und M. GOTTSCHALK (2009):

Application of a GPC-LC-MS/MS method for the determination of 31 mycotoxins in edible oils

LC GC North America **Feb2009 Supplement**, 38-39

GOYARTS, T., S. DÄNICKE, H. VALENTA und K.-H. UEBERSCHÄR (2007):

Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs

Food Additives and Contaminants **24**, 369-380

GROMADZKA, K., A. WASKIEWICZ, J. CHELKOWSKI und P. GOLINSKI (2008):

Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines

World Mycotoxin Journal **1**, 209-220

8. LITERATURVERZEICHNIS

GUEHI, T. S., Y. M. KONAN, R. KOFFI-NEVRY, N. D. YAO und N. P. MANIZAN (2007):

Enumeration and identification of main fungal isolates and evaluation of fermentation's degree of Ivorian raw cocoa beans

African Journal of Basic and Applied Sciences **1**, 479-486

GUEHI, T. S., N. D. YAO, N. P. MANIZAN, K. R. NEVRY, L. B. KOFFI und Y. M. KONAN (2008):

Comparison of the degree of fermentation and fungal profiles of raw cocoa beans sourced from three Ivorian main producing regions

African Journal of Food Science **2**, 112-118

HADIANI, M. R., H. YAZDANPANAHI, M. GHAZI-KHANSARI, A. M. CHERAGHALI und M. GOODARZI (2003):

Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry

Food Additives and Contaminants **20**, 380-385

HAGLER, W. M., G. Y. DANKO, L. HORVATH, M. PALYUSIK und C. J. MIROCHA (1980):

Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk

Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae **28**, 209-216

HANSEN, A. P. und R. E. WELTY (1970):

Microflora of raw cacao beans

Mycopathologia et Mycologia applicata **44**, 309-316

HANSEN, A. P., R. E. WELTY und R. SHEN (1973):

Free fatty acid content of cacao beans infested with storage fungi

Journal of Agricultural and Food Chemistry **21**, 665-670

8. LITERATURVERZEICHNIS

HIDY, P. H., R. S. BALDWIN, R. L. GREASHAM, C. L. KEITH and J. R. McMULLAN (1977):

Zearalenone and some derivates: Production and biological activities
Advances in Applied Microbiology **22**, 59-82

HÖRÜGEL, K., C. GEBHART, G. HANSCHMANN und H. MIETKE (2003):

Auswirkungen von Verpilzung und Mykotoxinbehaftung der Futtermittel auf
Leistung und Gesundheit bei Schweinen und Rindern
Gesunde Pflanzen **5**, 151-157

HOMBORG, K. (2012):

Herstellung von Schokolade und Kakao
<http://www.theobroma-cacao.de/wissen/herstellung/> (Stand: 17.4.2012)

HURST, W. J. und R. A. MARTIN JR. (1983):

High-performance liquid chromatographic determination of Ochratoxin A in
artificially spiked cocoa beans
Journal of Chromatography **265**, 352-356

HURST, W. J., K. P. SNYDER und R. A. MARTIN JR. (1987):

High-performance liquid chromatographic determination of the mycotoxins patulin,
penicillic acid, zearalenone and sterigmatocystin in artificially contaminated cocoa
beans
Journal of Chromatography **392**, 389-396

JAYEOLA, C. O. und A. O. OLUWADUN (2010):

Mycoflora and nutritional components of cocoa powder samples in South West
Nigeria
African Journal of Agricultural Research **5**, 2694-2698

JIMÉNEZ, M., T. HUERTA und R. MATEO (1997):

Mycotoxin Production by *Fusarium* Species Isolated From Bananas
Applied and Environmental Microbiology **63**, 364-369

JOSEPHS, R. D., R. SCHUHMACHER und R. KRSKA (2001):

International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities
Food Additives and Contaminants **18**, 417-430

KALTSCHMITT, M., H. HARTMANN und H. HOFBAUER (2009):

Energie aus Biomasse – Grundlagen, Techniken und Verfahren
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg

KAMIMURA, H., M. NISHIJIMA, K. YASUDA, K. SAITO, A. IBE, T. NAGAYAMA, H. USHIYAMA und Y. NAOI (1981):

Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs
Journal of the Association of Official Analytical Chemists **64**, 1067-1073

KAPPENSTEIN, O., A. BROCKMEYER, R. DIETRICH, V. CURTUI, H. KLAFFKE, J. LEPSCHY, E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER, C. SEIDLER, G. THIELERT, E. USLEBER, R. WEBER und J. WOLFF (2005a):

Zearalenon in Lebensmitteln
Mycotoxin Research **21**, 79-82

KAPPENSTEIN, O., H. KLAFFKE, I. MEHLITZ, R. TIEBACH, R. WEBER, J. LEPSCHY und R. WITTKOWSKI (2005b):

Bestimmung von Zearalenon in Speiseölen mit GPC und LC-ESI-MS/MS
Mycotoxin Research **21**, 3-6

KENNEDY, D. G., S. A. HEWITT, J. D. G. McEVOY, J. W. CURRIE, A. CANNAVAN, W. J. BLANCHFLOWER und C. T. ELLIOT (1998):

Zeranol is formed from *Fusarium* spp. Toxins in cattle *in vivo*
Food Additives and Contaminants **15**, 393-400

8. LITERATURVERZEICHNIS

- KIESSLING, K.-H., H. PETTERSSON, K. SANDHOLM und M. OLSEN (1984):
Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria
Applied and Environmental Microbiology **47**, 1070-1073
- KINANI, S., S. BOUCHONNET, S. BOURCIER, J.-M. PORCHER und S. AIT-AISSA (2008):
Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography–mass spectrometry analysis of environmental samples
Journal of Chromatography A **1190**, 307–315
- KLEINOVA, M., P. ZÖLLNER, H. KAHLBACHER, W. HOCHSTEINER und W. LINDNER (2002):
Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promotor zeranol in urine, liver and muscle of heifers
Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**, 4769-4776
- KOCH, M., S. STEINMEYER, R. TIEBACH, R. WEBER und P. WEYERSTAHL (1996):
Bestimmung von Ochratoxin A in Röstkaffee
Deutsche Lebensmittel Rundschau **92**, 48-51
- KOCHER U. (2006):
Multimethode zur Bestimmung von Mykotoxinen in Speiseölen mittels LC-MS-MS (Poster)
28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Polen
- KOKKONEN, M. K. und M. N. JESTOI (2009):
A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains
Food Analytical Methods **2**, 128-140
- KOERBER, K., T. MÄNNLE und C. LEITZMANN (2004):
Vollwert-Ernährung – Konzeption einer zeitgemäßen und nachhaltigen Ernährung
Karl F. Haug Verlag, Stuttgart

KOLB, B. (2003):

Gaschromatographie in Bildern – Eine Einführung
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

KRIST, S. (2013):

Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle
Springer-Verlag, Wien

KRÖMKER, V. (2007):

Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene
MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart

KRSKA, R. (1998):

Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals
Journal of Chromatography A **815**, 49-57

KRSKA, R. und R. JOSEPHS (2001):

The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **369**, 469-476

KRSKA, R. und A. MOLINELLI (2007):

Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends
Analytical and Bioanalytical Chemistry **387**, 145–148

KUIPER-GOODMAN, T., P. M. SCOTT und H. WATANABE (1987):

Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone
Regulatory Toxicology and Pharmacology **7**, 253-306

LANGE, I. G., A. DAXENBERGER und H. H. D. MEYER (2001):

Hormone contents in peripheral tissues after correct and off-label use of growth promoting hormones in cattle: Effect of the implant preparations Finaplix-H®, Ralgro®, Synovex-H® and Synovex Plus®
Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica **109**, 53-65

LAUREN, D. R. und M. A. RINGROSE (1997):

Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique
Food Additives and Contaminants Part A **14**, 435-443

LIAO, C.-D., H.-Y. LIN, L.-C. CHIUEH und D. Y.-C. SHIH (2011):

Simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in cereals by LC-MS/MS
Journal of Food and Drug Analysis **19**, 259-268

LINDSAY, S. (1996):

Einführung in die HPLC
Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden

LINNEMANN, M. und M. KÜHL (2005):

Biochemie für Mediziner
Springer-Verlag, 7. Auflage, Berlin/Heidelberg

LIOTI, M. B., A. SANTORO, R. BARBIERI, S. SALZANO und M. V. URSINI (2004):

Ochratoxin A und zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes
Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **557**, 19-27

LIST, P. H. und L. HÖRHAMMER (1979):

Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis
Band 6, Teil C, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

LIU, M.-T., B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1985):

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone
Applied and Environmental Microbiology **50**, 332-336

MAAROUFI, K., L. CHEKIR, E. E. CREPPY, F. ELLOUZ und H. BACHA (1996):

Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats

Toxicon **34**, 535-540

MAJERUS, P., N. GRAF und M. KRÄMER (2009):

Rapid determination of zearalenone in edible oils by HPLC with fluorescence detection

Mycotoxin Research **25**, 117-121

MAJERUS, P. und R. WOLLER (1984):

Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Mykotoxinanalytik

Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung **178**, 79-80

MAKUN, H. A., M. F. DUTTON, P. B. NJOBEL, M. MWANZA und A. Y. KABIRU (2011):

Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria

Mycotoxin Research **27**, 97-104

MALEKINEJAD H., R. MAAS-BAKKER und J. FINK-GREMMELS (2006):

Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone

The Veterinary Journal **172**, 96-102

MALEKINEJAD, H., E. J. SCHOEVERS, I. J. J. M. DAEMEN, C. ZIJLSTRA, B. COLENBRANDER, J. FINK-GREMMELS und B. A. J. ROELEN (2007):

Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs

Biology of Reproduction **77**, 840-847

MARAGOS, C. M. (2010):

Zearalenone occurrence and human exposure

World Mycotoxin Journal **3**, 369-383

MASSART, F., V. MEUCCI, G. SAGGESE und G. SOLDANI (2008):

High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins
The Journal of Pediatrics **152**, 690-695

MASSART, F. und G. SAGGESE (2010):

Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development
International Journal of Andrology **33**, 369-376

MATEO, J. J., R. MATEO, M. J. HINOJO, A. LLORENS und M. JIMÉNEZ (2002):

Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced
by *Fusarium* strains
Journal of Chromatography A **955**, 245-256

MC NUTT, S. H., P. PURWIN und C. MURRAY (1928):

Vulvovaginitis in swine; preliminary report
Journal of the American Veterinary Medical Association **73**, 448-492

MERINO, M., A. J. RAMOS und E. HERNÁNDEZ (1993):

A rapid HPLC assay for zearalenone in laboratory cultures of *Fusarium
graminearum*
Mycopathologia **121**, 27-32

MEYER, K., E. USLEBER, R. DIETRICH, E. MÄRTLBAUER und J. BAUER (2002):

Zearalenone metabolites in bovine bile
Archiv für Lebensmittelhygiene **53**, 115-117

MEYER, K., E. USLEBER, E. MÄRTLBAUER und J. BAUER (2000):

Vorkommen von Zearalenon, α - und β -Zearalenol in Gallen von Zuchtsauen in
Relation zum Fruchtbarkeitsgeschehen
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **113**, 374-379

8. LITERATURVERZEICHNIS

MILES, C. O., A. F. ERASMUSON, A. L. WILKINS, N. R. TOWERS, B. L. SMITH, I. GARTHWAITE, B. G. SCAHILL und R. P. HANSEN (1996):

Ovine metabolism of zearalenone to α -zearalanol (zeranol)
Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**, 3244-3250

MIROCHA, C. J. (1981):

Distribution and metabolism of (^3H)-zearalenone in a lactating cow
Journal of the American Oil Chemists' Society **58**, 597A

MIROCHA, C. J., C. M. CHRISTENSEN und G. H. NELSON (1967):

Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn
Applied Microbiology **15**, 497

MIROCHA, C. J., S. V. PATHRE und T. S. ROBISON (1981):

Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk
Food and Cosmetics Toxicology **19**, 25-30

MITTERBAUER, R., H. WEINDORFER, N. SAFAIE, R. KRSKA, M. LEMMENS, P. RUCKENBAUER, K. KUHLER und G. ADAM (2003):

A sensitive and inexpensive yeast bioassay for mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity
Applied and Environmental Microbiology **69**, 805-811

MÖLLER, J. M. (1973):

Mykotoxine in Futtermitteln
Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –forschung **151**, 231-236

MOODIE-KUBLALSINGH, S. (1994):

The Cocoa Panyols of Trinidad – An oral record
I.B. Tauris Verlag, London New York

MÜCKE, W. und CH. LEMMEN (2004):

Schimmelpilze – Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen.
ecomed MEDIZIN Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, 3. Auflage, Landsberg
am Lech

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) (1982):

Carcinogenicity bioassay of zearalenone in F344/N and F6C3F1 mice
National Toxicology Program Technical Reports Series 235, National Toxicology
Program, Research Triangle Park, NC, USA

NEUHOF, T., M. KOCH, T. RASENKO und I. NEHLS (2008):

Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat
harvest lot
Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 7566-7571

NILES, E. V. (1981):

Microflora of imported cocoa beans
Journal of Stored Products Research **17**, 147-150

OLIVEIRA, G. R., J. M. RIBEIRO, M. E. FRAGA, L. R. CAVAGLIERI, G. M. DIREITO,
K. M. KELLER, A. M. DALCERO und C. A. ROSA (2006):

Mycobiotica in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and
zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil
Mycopathologia **162**, 355-362

OYETUNJI, T. O. (2006):

Mycological evaluation of a ground cocoa-based beverage
African Journal of Biotechnology **5**, 2073-2076

PALLARONI, L. und C. VON HOLST (2003):

Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction
and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry
Journal of Chromatography A **993**, 39-45

PARK, J. J., E. B. SMALLEY und F. S. CHU (1996):

Natural occurrence of Fusarium mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop

Applied and Environmental Microbiology **62**, 1642-1648

PEI, S.-C., W.-J. LEE, G.-P. ZHANG, X.-F. HU, S. A. EREMIN und L.-J. ZHANG (2013):

Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA

Food Control **31**, 65-70

PFEIFFER, E., A. HILDEBRAND, G. DAMM, A. RAPP, B. CRAMER, H.-U. HUMPF und M. METZLER (2009):

Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro

Molecular Nutrition & Food Research **53**, 1123-1133

PFEIFFER, E., A. HILDEBRAND, H. MIKULA und M. METZLER (2010):

Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms

Molecular Nutrition & Food Research **54**, 1468–1476

PITT, J. I. und A. D. HOCKING (2009):

Fungi and Food Spoilage

Springer-Verlag, 3. Auflage, Dordrecht/Heidelberg/London/New York

PRELUSKY, D. B., P. M. SCOTT, H. L. TRENHOLM und G. A. LAWRENCE (1990):

Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows

Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes **25**, 87-103

RATERS, M. (2008):

Mykotoxine in Kakao und Kakaoprodukten

Diss. TU Berlin, Shaker Verlag GmbH, 1. Auflage, Aachen

- REN, Y., Y. ZHANG, S. SHAO, Z. CAI, L. FENG, H. PAN und Z. WANG (2007):
Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
Journal of Chromatography A **1143**, 48-64
- RICHARD, J. L., G. A. BENNETT, P. F. ROSS und P. E. NELSON (1993):
Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food
Journal of Animal Science **71**, 2563-2574
- RIMBACH, G., J. MÖHRING und H. F. ERBERSDOBLER (2010):
Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger
Springer-Verlag, Heidelberg/Dordrecht/London/New York
- RODRIGUES, I., J. HANDL und E. M. BINDER (2011):
Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa
Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance **4**, 168-179
- ROMAGNOLI, B., M. FERRARI und C. BERGAMINI (2010):
Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry
Journal of Mass Spectrometry **45**, 1075-1080
- RYU, D., M. A. HANNA, K. M. ESKRIDGE und L. B. BULLERMAN (2003):
Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system
Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**, 1746 - 1748
- SALTINI, R., R. AKKERMAN und S. FROSCH (2013):
Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality
Food Control **29**, 167-187

SÁNCHEZ-HERVÁS, M., J. V. GIL, F. BISBAL, D. RAMÓN und P. V. MARTÍNEZ-CULEBRAS (2008):

Mycobiotica and mycotoxin producing fungi from cocoa beans
International Journal of Food Microbiology **125**, 336-340

SCHAAFSMA, A. W., R. W. NICOL, M. E. SAVARD, R. C. SINHA, L. M. REID und G. ROTTINGHAUS (1998):

Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography
Mycopathologia **142**, 107-113

SCHAARSCHMIDT, C. (2008):

Theobromin – Zur Geschichte und Gegenwart eines Wirkstoffs
Diss. med. München

SCHOELLER, H. W. (1969):

Tee, Kaffee, Kakao
Heyne Verlag, 2. Auflage, München

SCHOLLENBERGER, M., H.-M. MÜLLER, M. RÜFLE, S. SUCHY, S. PLANCK und W. DROCHNER (2005):

Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany
International Journal of Food Microbiology **97**, 317-326

SCHOLTEN, J., I. R. PIZZUTTI, A. DE KOK, M. DE KROON, W. WIND und W. AZAMBUJA (2010):

Survey of pesticides and mycotoxins in cocoa beans using a modified QuEChERS method with UPLC-MS/MS (ESI+), GC-MS (SQ-NCI-SIM) and GC-MS/MS (TQ-EI) Detection (Poster)
World Mycotoxin Forum, 8.-10. November 2010, Noordwijk, Niederlande

SCHWADORF, K. (1995):

Pilzbesatz und Mykotoxine in Futtermitteln
Diss. Universität Hohenheim

SCHWADORF, K. und H.-M. MÜLLER (1992):

Determination of α - and β -zearalenol and zearalenone in cereals by gas chromatography with ion-trap detection

Journal of Chromatography **595**, 259-267

SEELING, K., S. DÄNICKE, K.-H. UEBERSCHÄR, P. LEBZIEN und G. FLACHOWSKY (2005):

On the effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows

Food Additives and Contaminants **22**, 847-855

SEGVIC KLARIC, M., Z. CVETNIC, S. PEPELJNJAK und I. KOSALEC (2009):

Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography

Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **60**, 427-434

SEIDLER, C. (2007):

Nachweis der Fusarientoxine Deoxynivalenol und Zearalenon in Lebensmitteln

Diss. med. vet. Giessen

SENYUVA, H., J. GILBERT, S. ÖZCAN und N. GÜREL (2008):

Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in food

World Mycotoxin Journal **1**, 229-235

SHEPHARD, G. S. (2008):

Determination of mycotoxins in human food

Chemical Society Reviews **37**, 2468-2477

SHREEVE, B. J., D. S. P. PATTERSON und B. A. ROBERTS (1979):

The carry over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows

Food and Cosmetics Toxicology **17**, 151-152

SIEGEL, D., K. ANDAE, M. PROSKE, C. KOCHAN, M. KOCH, M. WEBER und I. NEHLS (2010):

Dynamic covalent hydrazine chemistry as a selective extraction and cleanup technique for the quantification of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in edible oils
Journal of Chromatography A **1217**, 2206-2215

<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc/discovery-c18-c8-hplc-columns.html> (Stand: 01.11.11)

SILVA, D. C. G. und E. A. VARGAS (2001):

A survey of zearalenone in corn using Romer MycosepTM 224 column and high performance liquid chromatography
Food Additives and Contaminants **18**, 39-45

SOLEIMANY, F., S. JINAP und F. ABAS (2012):

Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry
Food Chemistry **130**, 1055-1060

SOLOVEY, M. M. S., C. SOMOZA, G. CANO, A. PACIN und S. RESNIK (1999):

A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina
Food Additives and Contaminants **16**, 325-329

SORENSEN, L. K. und T. H. ELBAEK (2005):

Determinations of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry
Journal of Chromatography B **820**, 183-196

STOB, M., R. S. BALDWIN, J. TUIITE, F. N. ANDREWS und K. G. GILLETTE (1962):

Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Giberella zeae*
Nature **196**, 1318

STRAUSS, H. (1997):

Die Durchführung der Lebensmittelkontrolle in der Schweiz im Jahre 1995
Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene **87**, 396-397

SYDENHAM, E. W., P. G. THIEL und R. VLEGGAR (1996):

Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins
Journal of AOAC International **79**, 1365-1379

SYPECKA, Z., M. KELLY und P. BRERETON (2004):

Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: Effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs
Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**, 5463-5471

TAFURI, A., R. FERRACANE und A. RITIENI (2004):

Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products
Food Chemistry **88**, 487-494

TANAKA, T., A. YONEDA, S. INOUE, Y. SUGIURA und Y. UENO (2000):

Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry
Journal of Chromatography A **882**, 23-28

TESHIMA R., M. KAWASE, T. TANAKA, K. HIRAI, M. SATO, J. SAWADA, H. IKEBUCHI, M. ICHINOE und T. TERAOKA (1990):

Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone
Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**, 1618-1622

THIEU, N. Q., B. OGLE und H. PETTERSSON (2008):

Screening of Aflatoxins and Zearalenone in feedstuffs and complete feeds for pigs in Southern Vietnam
Tropical Animal Health and Production **40**, 77-83

8. LITERATURVERZEICHNIS

THONGRUSSAMEE, T., N. S. KUZMINA, W.-B. SHIM, T. JIRATPONG, S. A. EREMIN, J. INTRASOOK und D.-H. CHUNG (2008):

Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals

Food Additives and Contaminants **25**, 997-1006

TIEMANN, U., K.-P. BRÜSSOW, D. DANNENBERGER, L. JONAS, R. PÖHLAND, K. JÄGER, S. DÄNICKE und E. HAGEMANN (2008a):

The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) on the spleen and liver of sow and fetus from day 35 to 70 of gestation

Toxicology Letters **179**, 113-117

TIEMANN, U., K.-P. BRÜSSOW, U. KÜCHENMEISTER, L. JONAS, R. PÖHLAND, A. REISCHAUER, K. JÄGER und S. DÄNICKE (2008b):

Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone

The Veterinary Journal **176**, 188-196

TSAKMAKIDIS, I. A., A. G. LYMBEROPOULOS, T. A. A. KHALIFA, C. M. BOSCOS, A. SARATSI und C. ALEXOPOULOS (2007):

Evaluation of zearalenone and α -zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity

Journal of Applied Toxicology **28**, 681-688

USLEBER, E. und E. MÄRTLBAUER (1998):

A limited survey of cereal foods from German retail market for *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins)

Archiv für Lebensmittelhygiene **49**, 42-45

USLEBER, E., V. RENZ, E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1992):

Studies on the application of enzyme immunoassays for the fusarium mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone

Journal of Veterinary Medicine, Series B **39**, 617-627

VÄLIMAA, A.-L., A. T. KIVISTÖ, P. I. LESKINEN und M. T. KARP (2010):

A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk
Journal of Microbiological Methods **80**, 44-48

VAN BENNEKOM, E. O., L. BROUWER, E. H. M. LAURANT, H. HOOIJERINK und
M. W. F. NIELEN (2002):

Confirmatory analysis method for zeranol, its metabolites and related mycotoxins in
urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry
Analytica Chimica Acta **473**, 151-160

VENDL, O., F. BERTHILLER, C. CREWS und R. KRSKA (2009):

Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their masked
metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS
Analytical and Bioanalytical Chemistry **395**, 1347-1354

VIDEMANN, B., M. MAZALLON, J. TEP und S. LECOEUR (2008):

Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2
cells
Food and Chemical Toxicology **46**, 3279-3286

VLATTAS, I., I. T. HARRISON, L. TÖKÉS, J. H. FRIED und A. D. CROSS (1968):

Synthesis of DL-Zearalenone
Journal of Organic Chemistry **33**, 4176

VOGESER, M. und K. G. PARHOFER (2007):

Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and
Applications in Endocrinology
Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes **115**, 559-570

WINTER, P., H. NAU, A. LAMPEN und J. KAMPHUES (2008):

Detection of estrogenically active substances in diets for sows by an in vitro bioassay
supported by HPLC analysis
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **92**, 337-344

YU, Z., L. ZHANG, D. WU und F. LIU (2005):

Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells

Ecotoxicology and Environmental Safety **62**, 441-446

ZINEDINE, A., J. M. SORIANO, J. C. MOLTO und J. MANES (2007):

Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin

Food and Chemical Toxicology **45**, 1-18

ZÖLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER und W. LINDNER (2002):

Concentration Levels of Zearalenone and Its Metabolites in Urine, Muscle Tissue, and Liver Samples of Pigs Fed with Mycotoxin-Contaminated Oats

Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**, 2494-2501

ZÖLLNER, P., J. JODLBAUER und W. LINDNER (1999):

Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns

Journal of Chromatography A **858**, 167–174

ZWIERZCHOWSKI, W., M. PRZYBYŁOWICZ, K. OBREMSKI, L. ZIELONKA, E. SKORSKA-WYSZYNSKA, M. GAJECKA, M. POLAK, E. JAKIMIUK, B. JANA, L. RYBARCZYK und M. GAJECKI (2005):

Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone micotoxicosis

Polish Journal of Veterinary Science **8**, 209-218

zitierter Gesetze, Verordnungen, Richtlinien

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN

nach § 64 LFGB, Band 1 (L), L.13.04/XX:

Bestimmung von Zearalenon in pflanzlichen Ölen – HPLC-FLD-Verfahren

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN

nach § 64 LFGB, § 35 LMBG (2003) Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen zur Methodenvalidierung

BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2005):

ADV-Kodierungskataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittelmonitoring („ZEBS-Code“)

http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/acrylamid/lm_acrylamid_adv_katalog3.pdf?__blob=publicationFile&v=2 (Stand: 03.02.2012)

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (2010):

Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln (Kontaminanten-Verordnung -KmV) vom 19. März 2010 (BGBl. I S. 287)

BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT (1999):

Mykotoxin-Höchstmengenverordnung

Fassung vom 02. Juni 1999 (Bundesgesetzblatt I S. 1248), zuletzt geändert am 22. Februar 2006 (Bundesgesetzblatt I S. 444)

DIN ISO 5725-2 (2002):

Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen; Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens

DIN 38402 – A 45 (2002):

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Allgemeine Angaben (Gruppe A) – Teil 45: Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle von Laboratorien (A 45)

ERIKSEN, G. S., J. PENNINGTON, J. SCHLATTER, J. ALEXANDER und A. THUVANDER (2000):

Zearalenone – First draft prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organisation, Geneva, 2000 IPCS - International Programme on Chemical Safety

EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (2000):

Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA)

Directorate General Health and Consumer Protection

SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final

EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (2003):

Working Document of The Expert Committee “Agricultural Contaminants“ of the European Commission Scientific Committee for Food. Council Meeting of November 2003

EUROPEAN COMMISSION, SCOOP (2003):

Reports on Tasks 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. April 2003, Directorate General Health and Consumer Protection

<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf> (Stand: 03.02.2012)

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2004):

Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed (Question N° EFSA-Q-2003-037)

The EFSA Journal **89**, 1-35

<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/89.pdf>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA (2011):

Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food

(Question N° EFSA-Q-2010-00958)

EFSA Journal **9**, 2197-2320

<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2197.pdf>

KAKAOVERORDNUNG (KAKAOV) (2003):

Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung)

Vom 15. Dezember 2003 (Bundesgesetzblatt I S. 2738), zuletzt geändert am 30. September 2008 (Bundesgesetzblatt I S. 1911)

VERORDNUNG (EG) Nr. 401/2006 DER KOMMISSION vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln

Amtsblatt der Europäischen Union L70/12-34 vom 09.03.2006

VERORDNUNG (EG) Nr. 1881/2006 DER KOMMISSION vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln

Amtsblatt der Europäischen Union L364/5-24 vom 20.12.2006

VERORDNUNG (EG) Nr. 1126/2007 DER KOMMISSION

vom 28. September 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln hinsichtlich Fusarientoxinen in Mais und Maiserzeugnissen

Amtsblatt der Europäischen Union L255/14-17 vom 29.09.2007

Verordnung zur Begrenzung von Kontaminanten in Lebensmitteln und zur Änderung oder Aufhebung anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 19. März 2010; Bundesgesetzblatt I Nr. 12 S. 286, zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 09. August 2012 (BGBl I S. 1710)

Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung) vom 28. April 2005 (BGBl. I S. 1161), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 25. Februar 2014 (BGBl I S. 218)

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber für die Überlassung des interessanten Themas sowie für sein unermüdliches Interesse und seine fortwährende Geduld, seine Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften. Insbesondere Frau Renate Stumpf, Frau Margit Keßler, Frau Dr. Yvonne Ackermann, Frau Dr. Madeleine Groß und Frau Christa Zeidler möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gemeinsamen Zeit im Institut danken.

Ebenso danke ich meinen Mitdoktoranden/-innen für die gegenseitige Hilfe und für die Aufmunterungen während der vielen gemeinsamen Laborstunden.

Weiter möchte ich dem Leiter des Nationalen Referenzlabors für Mykotoxine (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) in Berlin Dr. Horst Klaffke für die Durchführung der LC-MS/MS Untersuchungen herzlich danken. Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Rolf Geisen aus dem Max Rubner Institut in Karlsruhe für die mykologische Anzucht einiger Proben und die anschließende Aufklärung der vorhandenen Pilzisolat.

Ich danke ganz besonders meinem Verlobten Manuel, der mich bei der Anfertigung dieser Arbeit durch seine liebevolle Anteilnahme, den Glauben an mich sowie seiner unermüdlichen Geduld und Toleranz so wertvoll unterstützt hat.

Auch bei meinen Freundinnen, besonders bei Dani, bedanke ich mich für ihre freundschaftliche Hilfe und die vielen schönen gemeinsamen Stunden während des Studiums und der Doktorarbeit.

Viel Dank gilt auch meiner Schwester Lena für ihre großzügige Unterstützung bei den Korrekturen zur Anfertigung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mir sowohl das Studium als auch die Dissertation überhaupt erst ermöglichten und immer für mich da sind. Ihrer bedingungs- und grenzenlosen Unterstützung in jeglicher Hinsicht verdanke ich nicht nur das Gelingen dieser Arbeit. Danke!

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Julia Catharina Dinkelacker

